



TUGAS AKHIR - SB141510

**POTENSI LIMBAH *VISCERAL* RUMAH POTONG
HEWAN (RPH) PEGIRIAN UNTUK PRODUKSI
LIPASE OLEH ISOLAT *Bacillus* sp. SK II-5**

**KHOLILAH NUR HIDAYAH
NRP. 1512 100 046**

**Dosen Pembimbing
Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo MT.**

Jurusan Biologi
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2016



FINAL PROJECT - SB141510

**VISCERAL ORGAN WASTE AS A SUBSTRATE
FOR LIPASE PRODUCTION BY *Bacillus* sp.
SKII-5**

**KHOLILAH NUR HIDAYAH
NRP. 1512 100 046**

**Advisor Lecturer
Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo MT.**

**Biology Department
Mathematic and Natural Science Faculty
Sepuluh Nopember Institute of Technology
Surabaya 2016**

**LEMBAR PENGESAHAN
TUGAS AKHIR**

**POTENSI LIMBAH *VISCERAL* RUMAH POTONG
HEWAN (RPH) UNTUK PRODUKSI LIPASE OLEH
ISOLAT *Bacillus* sp. SK II-5**

Oleh :

**KHOLILAH NUR HIDAYAH
NRP. 1512 100 046**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si (Pembimbing 1)

Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T. (Pembimbing 2)

Surabaya, 24 Juni 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Dr. Kholilah Nur Hidayati, M.Si
NIP. 19691121 199802 2 001

POTENSI LIMBAH VISCERAL RUMAH POTONG
HEWAN (RPH) UNTUK PRODUKSI LIPASE OLEH ISOLAT
Bacillus sp. SK II-5

Nama Mahasiswa : Kholilah Nur Hidayah
NRP : 1512 100 046
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Awik Puji Dyah N., M.Si.
Dr.techn. Endry Nugroho P., MT.

Abstrak

Limbah padat dan cair rumah potong hewan yang langsung dibuang ke lingkungan tanpa diolah terlebih dahulu berpotensi mengkontaminasi udara, air dan tanah sehingga menyebabkan pencemaran yang sulit didegradasi. Salah satu limbah padat RPH adalah organ visceral dengan kandungan lipid yang tinggi. Pada prinsipnya limbah RPH juga memiliki potensi untuk pertumbuhan bakteri termofilik yang mampu menghasilkan berbagai macam enzim yaitu protease, kitinase dan lipase.

*Lipase atau triacylglycerol acylhydrolases (EC3.1.1.3) termasuk dalam kelas enzim yang mengkatalisis hidrolisis trigliserida rantai panjang dan merupakan kelompok yang paling penting dari biokatalisis untuk aplikasi bioteknologi. Lipase dapat diproduksi dengan menggunakan mikroorganisme sebagai isolat. Kelompok yeast, fungi, dan bakteri merupakan mikroba penghasil lipase. Strain bakteri memiliki potensi yang lebih besar untuk memproduksi lipase karena aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya. Tujuan penelitian ini untuk memanfaatkan limbah padat RPH berupa organ visceral (intestinum dan rumen) sebagai substrat dalam produksi lipase oleh *Bacillus* sp. SKII-5 serta mengetahui konsentrasi substrat optimum dalam produksi lipase.*

*Penelitian ini diawali dengan pengujian kualitatif *Bacillus* sp. SK II-5 dengan hasil positif sebagai bakteri lipolitik menggunakan medium tween80 agar medium. Setelah hasil*

didapatkan dilanjutkan dengan persiapan media kultur dan aklimatisasi. Sumber karbon utama berasal dari lemak intestinum dan rumen. Kemudian dilakukan produksi lipase dengan dengan variasi konsentrasi substrat yaitu 0,11%, 0,21%, 0,31% dan 0,42%. Aktivitas tertinggi crude lipase adalah menggunakan lemak 0,11% intestinum yaitu 2858.6 U/ml dengan kandungan protein sebesar 0,102 mg/ml dan substat 0,21% rumen memiliki aktivitas 3009,3 U/ml dengan kandungan protein sebesar 0,220 mg/ml.

Selanjutnya, dilakukan proses isolasi dan produksi lipase dengan metode sentrifugasi dan diikuti dengan uji aktivitas lipase. Selanjutnya dilakukan produksi lipase dengan menggunakan kedua substrat tersebut, lipase diisolasi menggunakan metode sentrifugasi dan metode purifikasi menggunakan presipitasi amonium sulfat bertingkat. Lipase terkonsentrasi pada 60-75% dengan aktivitas enzim tertinggi yaitu 1717,3 U/ml dan 1642.6 U/ml. Titik isoelektrik lipase adalah pH 5 dan hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan bahwa lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp. SK II-5* memiliki berat molekul 43,3 kDa.

Kata kunci : *Bacillus sp. SK II-5, Lipase, Lipid, Organ Visceral.*

VISCERAL ORGAN WASTE AS SUBSTRATE FOR LIPASE PRODUCTION BY *Bacillus* sp. SK II-5

Student Name : Kholilah Nur Hidayah
NRP : 1512 100 046
Department : Biologi
Supervisor : Dr. Awik Puji Dyah N., M.Si.
Dr.techn. Endry Nugroho P., MT.

Abstract

Solid and liquid waste from slaughterhouses are discharged directly into the environment without being processed that caused contamination of air, water and soil. One of solid slaughterhouses waste is visceral organs which contain high lipid content. Besides, this waste has function as medium growth of thermophilic bacteria to produce a wide variety of lipolytic enzymes, such as protease, chitinase, and lipase.

Lipase or triacylglycerol acylhydrolases (EC3.1.1.3) is the most important group of biocatalyst for biotechnology. Lipase catalyze the hydrolysis of long chain triglycerides. Lipases have emerged as one of the leading biocatalysts with proven potential for contributing to the multibillion dollar underexploited lipid technology bio-industry and multifaceted industrial applications. Lipase could be produced by microorganisms such as yeast, fungi, and bacteria. Strains of bacteria have a greater potential to produce lipase because a higher enzyme activity than others. The aim of this research is utilize solid slaughterhouses waste of visceral organs (the intestine and rumen) as a substrate to produce lipase from *Bacillus* sp. SK II-5 and determine the optimum substrate concentration to lipase production.

Lipase produce by *Bacillus* sp. SK II-5 as lipolytic bacteria which confirmed use tween80 agar medium. After the results obtained, *Bacillus* sp. SK II-5 inoculated to starter preparation and acclimatization. Carbon source was provided by fat which isolated from the tissue of bovine intestine and rumen. Substrate

with variation of concentration is 0.11%, 0.21%, 0.31% and 0.42%. The highest lipase activity was determined from substrate 0.11% intestine and 0.21% rumen fat with activity 2858.6 U/ml and 3009.3 U/ml, respectively. Lipase was isolated by centrifugation method and to precipitate lipase by ammonium sulfate, experiment conducted with 15-30%, 30-45%, 45-60%, 60-75% and 75-90%, Results revealed that 60-75% saturation was proved to be effective for maximum specific activity of 1717.3 U/ml and 1642.6 U/ml. Isoelectric point of lipase is pH 5. The molecular weight of lipase which produced by *Bacillus* sp. SKII-5 is 43,3 kDa by SDS-PAGE.

Keywords: *Bacillus* sp. SK II-5, Lipase, Lipid, Visceral Organ Waste.

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN PENGESAHAN | ii |
| ABSTRAK | iii |
| <i>ABSTRACT</i> | v |
| KATA PENGANTAR | vii |
| DAFTAR ISI | viii |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR LAMPIRAN | xii |
| BAB I PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Permasalahan | 2 |
| 1.3 Batasan Masalah | 3 |
| 1.4 Tujuan | 3 |
| 1.5 Manfaat | 3 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Limbah Rumah Potong Hewan | 5 |
| 2.2 Organ <i>Visceral</i> Ruminansia..... | 6 |
| 2.3 Mekanisme Transfer dan Penyerapan Lipid pada Ruminansia | 8 |
| 2.4 Mikroorganisme Lipolitik | 9 |
| 2.5 <i>Bacillus</i> sp. | 10 |
| 2.6 Lipase | 12 |
| 2.7 Mekanisme Katalisis Enzim Lipase | 13 |
| 2.8 Optimasi Substrat dalam Produksi Enzim Lipase | 14 |
| BAB III METODOLOGI | |
| 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian | 17 |
| 3.2 Metode yang Digunakan | 17 |
| 3.2.1 Mikroorganisme | 18 |
| 3.2.1.1 Peremajaan <i>Bacillus</i> sp. SK II-5..... | 18 |
| 3.2.1.2 Pengujian Kualitatif Bakteri Lipolitik | 18 |
| 3.2.1.3 Pembuatan Starter <i>Bacillus</i> sp. SK II-5 | 19 |
| 3.2.1.4 Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SKII-5 dalam | |

| | |
|---|----|
| Media Produksi..... | 19 |
| 3.2.2 Preparasi Media..... | 19 |
| 3.2.2.1 Persiapan Media Kultur..... | 19 |
| 3.2.2.2 Persiapan Media Aklimatisasi..... | 20 |
| 3.2.2.3 Persiapan Media Fermentasi | 20 |
| 3.2.3 Produksi Lipase | 21 |
| 3.2.4 Purifikasi Lipase..... | 21 |
| 3.2.5 Uji Aktivitas Lipase | 23 |
| 3.2.5.1 Pembuatan Kurva Standart 4-Nitrophenol..... | 23 |
| 3.2.5.2 Pengujian Aktivitas Lipase..... | 23 |
| 3.2.6 Uji Kandungan Protein | 23 |
| 3.2.6.1 Pembuatan Pereaksi Bradford..... | 23 |
| 3.2.6.2 Pembuatan Kurva Standart BSA..... | 24 |
| 3.2.6.3 Pengujian Kandungan Protein..... | 24 |
| 3.2.7 Titik Isoelektrik | 25 |
| 3.2.8 Pengukuran Berat Molekul Lipase menggunakan SDS-PAGE..... | 25 |
| 3.2.9 Analisa Kadar (%) Karbon (C), Hidrogen (H) dan Nitrogen (N)..... | 26 |
| 3.2.9.1 Penentuan C Metode Walkey Black..... | 26 |
| 3.2.9.2 Penentuan H Total..... | 27 |
| 3.2.9.3 Penentuan N Total Metode Kjeldhal..... | 27 |
| 3.3 Analisa Data | 28 |
| 3.3.1 Penyusunan, Pengolahan dan Analisa Data..... | 28 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 4.1 Optimasi Jenis Substrat terhadap Produksi Lipase.... | 29 |
| 4.2 Produksi dan Isolasi Lipase..... | 32 |
| 4.3 Purifikasi Lipase..... | 34 |
| 4.4 Karakterisasi Lipase..... | 36 |
| BAB V PENUTUP | |
| 5.1 Kesimpulan..... | 39 |
| 5.2 Saran..... | 39 |
| DAFTAR PUSTAKA | 41 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1 Organ Pencernaan dalam Abdomen Sapi..... | 6 |
| Gambar 2.2 Bagian Rumen yang Digunakan sebagai Substrat..... | 7 |
| Gambar 2.3 Bagian <i>Intestinum</i> yang Digunakan sebagai Substrat..... | 7 |
| Gambar 2.4 Mekanisme Penyerapan Lipid secara Difusi..... | 8 |
| Gambar 2.5 Morfologi <i>B. cereus</i> ATCC 10987 | 11 |
| Gambar 2.6 Hidrolisis Triglicerida Menjadi Asam Lemak dan Gliserol..... | 12 |
| Gambar 2.7 Struktur 3D Lipase <i>B. subtilis</i> | 13 |
| Gambar 2.8 Mekanisme Reaksi Lipase..... | 14 |
| Gambar 4.1 Kadar (%) Karbon, Hidrogen dan Nitrogen dalam Lemak Intestinum dan Rumen serta Berat Lemak Hasil Pemisahan. | 29 |
| Gambar 4.2 Visualisasi Aktivitas Lipase dan Reaksi Kandungan Protein..... | 31 |
| Gambar 4.3 Aktivitas dan Kandungan Protein <i>Crude</i> Lipase..... | 31 |

| | | |
|------------|---|----|
| Gambar 4.4 | Visualisasi Medium Produksi Lipase | 33 |
| Gambar 4.5 | Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SKII-5..... | 34 |
| Gambar 4.6 | Aktivitas Lipase dan Kandungan Protein dalam Proses Purifikasi..... | 35 |
| Gambar 4.7 | Koagulasi yang Menunjukkan Titik Isoelektrik..... | 36 |
| Gambar 4.8 | Hasil SDS PAGE Lipase..... | 37 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|-------------|---|
| Lampiran 1 | Skema Kerja Penelitian..... 51 |
| Lampiran 2 | Medium Fermentasi..... 52 |
| Lampiran 3 | Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl pH ,0 konsentrasi 50 mM..... 53 |
| Lampiran 4 | Kurva Standart 4-Nitrophenol..... 54 |
| Lampiran 5 | Pembuatan Kurva Standart BSA..... 55 |
| Lampiran 6 | Perhitungan Aktivitas Enzim dan Kandungan Protein Lipase..... 57 |
| Lampiran 7 | Karakteristik Lemak Hasil Pemisahan dari Jaringan..... 58 |
| Lampiran 8 | Aktivitas dan Kandungan Protein Enzim Kasar (<i>Crude</i>) Lipase..... 59 |
| Lampiran 9 | Nilai Absorbansi Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SKII-5..... 60 |
| Lampiran 10 | Aktivitas dan Kandungan Protein Lipase Hasil Purifikasi Ammonium Sulfat..... 61 |
| Lampiran 11 | Kurva Standar Marker..... 66 |
| Lampiran 12 | Dokumentasi Peremajaan <i>Bacillus</i> sp. SKII-5..... 67 |
| Lampiran 13 | Organ <i>Visceral</i> dan Lemak..... 68 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumah pemotongan hewan (RPH) dan industri pengolahan daging menghasilkan limbah organik utama berupa lipid (Salminen *et al.*, 2002; Cirne, *et al.*, 2007). Lipid yang terkandung dalam limbah padat dan cair yang langsung dibuang ke lingkungan tanpa diolah terlebih dahulu. Hal ini berpotensi mengkontaminasi udara, air dan tanah sehingga menyebabkan pencemaran yang sulit didegradasi (Mobarak-Qamsari *et al.*, 2011; Prasad & Manjunath *et al.*, 2011).

Salah satu limbah padat RPH adalah organ *visceral* dengan kandungan lipid yang tinggi (Dodson *et al.*, 2010). *Visceral* merupakan organ dalam rongga perut yang memiliki peranan penting dalam metabolisme dan pembentukan energi (Kozloski, *et al.*, 2001; Moran, 2005). Kandungan lipid dalam organ *visceral* tergantung pada fungsi dari organ *visceral* tersebut. Proses metabolisme, transport dan penyerapan lipid yang mempengaruhi banyaknya kandungan lipid dalam organ *visceral* (Bauchart, 1992; Moran, 2005).

Umumnya setiap satu ekor sapi memiliki organ *visceral* sebesar 10% dari total berat tubuh (Anugwa *et al.*, 1989), sekitar 25-35 kg/ekor (Padmono, 2005). RPH Pegirian memiliki 300 ekor sapi (dipotong 150 ekor dan di kandang 150 ekor) yang setiap harinya menghasilkan limbah (Rahmawati, 2013). Pemanfaatan limbah padat RPH masih memiliki nilai jual yang rendah contohnya sabun, detergen, dan pembungkus sosis (Ramani *et al.*, 2010; Jayathilakan *et al.*, 2012). Pada prinsipnya limbah RPH juga memiliki potensi untuk pertumbuhan bakteri termofilik yang mampu menghasilkan berbagai macam enzim yaitu protease, kitinase, dan lipase (López *et al.*, 2005).

Lipase atau *triacylglycerol acylhydrolases* (EC3.1.1.3) merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan bekerja sebagai katalis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut

dalam air (Rakesh Kumar *et al.*, 2012). Fungsi alami lipase adalah menghidrolisis trigliserida menjadi digliserid, monogliserida, asam lemak bebas dan gliserol (Houde *et al.*, 2004). Selain hidrolisis, lipase mampu mengkatalisis berbagai macam reaksi lain seperti: inter-esterifikasi, alkoholisis, asidolisis, esterifikasi dan aminolisis (Jaeger & Eggert, 2002; Vakhlu & Kour, 2006).

Beberapa mikroorganisme yang mampu memproduksi lipase adalah dari kelompok yeast *Candida rugosa*, *C. antarctica*, *C. viswanathii*, kelompok fungi *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp., actinomycetes dan bakteri (Gunasekaran & Das, 2005; Vakhlu & Kour, 2006; Mohan *et al.*, 2008; Papanikolaou *et al.*, 2011; Bayoumi *et al.*, 2012; de Almeida *et al.*, 2013). Strain bakteri memiliki potensi yang lebih besar untuk memproduksi lipase karena aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya (Ramani *et al.*, 2010; Bayoumi *et al.*, 2012).

Bakteri lipolitik memiliki kemampuan untuk produksi lipase (Jaeger *et al.*, 1999) salah satunya adalah *Bacillus* sp. (Gupta *et al.*, 2004). *B. pumilus* yang diisolasi dari tanah tercemar dan ditumbuhkan dalam substrat *tributylin* dapat memproduksi lipase dengan aktivitas sampai 3.526,6 U/mg (Rakesh Kumar *et al.*, 2012), sedangkan *Pseudomonas gessardii* yang ditumbuhkan dalam substrat limbah RPH berupa lemak kambing, memiliki aktivitas lipase yaitu 1.473 U/mg (Ramani *et al.*, 2010).

Lipase memiliki banyak manfaat dalam industri farmasi, makanan, detergen, tekstil, produksi kertas dan kosmetik, biokonversi media perairan, dan industri *oleochemical* (Houde *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2001). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan limbah padat RPH berupa organ *visceral* sapi sebagai substrat dalam produksi lipase oleh *Bacillus* sp. SKII-5.

1.2 Rumusan Masalah

Limbah padat rumah potong hewan (RPH) belum diolah secara maksimal sehingga menimbulkan pencemaran disekitar

RPH. Selain itu, organ *visceral* memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai substrat dan sumber karbon bakteri lipolitik untuk menghasilkan lipase. Berdasarkan hal tersebut, dapat dirumuskan masalah bagaimana memanfaatkan limbah padat *visceral* untuk memproduksi lipase oleh isolat *Bacillus* sp. SKII-5.

1.3 Batasan Masalah

Penelitian ini menggunakan batasan sebagai berikut.

1. Penelitian ini dilakukan dengan bahan dari limbah padat rumah potong hewan yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya.
2. Organ *visceral* yang digunakan adalah *intestinum* dan *rumen*.
3. Mikroorganisme lipolitik yang digunakan adalah *Bacillus* sp. SKII-5.
4. Produksi lipase dalam penelitian ini dilakukan dalam skala laboratorium.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah memanfaatkan limbah padat RPH berupa organ *visceral* (*intestinum* dan *rumen*) sebagai substrat dalam produksi lipase oleh *Bacillus* sp. SKII-5.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah mengurangi limbah padat RPH yang menyebabkan pencemaran lingkungan dari lipid yang terkandung dalam organ *visceral*. Selain itu, meningkatkan nilai potensi limbah yang mengandung lipid tinggi dengan memanfaatkannya sebagai substrat dalam produksi lipase oleh *Bacillus* sp. SKII-5.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Limbah Rumah Potong Hewan

Rumah Potong Hewan (RPH) merupakan suatu bangunan atau kompleks bangunan dengan desain dan syarat tertentu yang digunakan sebagai tempat memotong hewan bagi konsumsi masyarakat umum (Peraturan Menteri Pertanian No. 13 Tahun 2010). RPH Pegirian merupakan Perusahaan Daerah (PD) terbesar di Surabaya yang menyediakan jasa pemotongan hewan untuk sapi, kambing dan babi. RPH berlokasi di Jl. Pegirian No. 258 (Rahmawati, 2013).

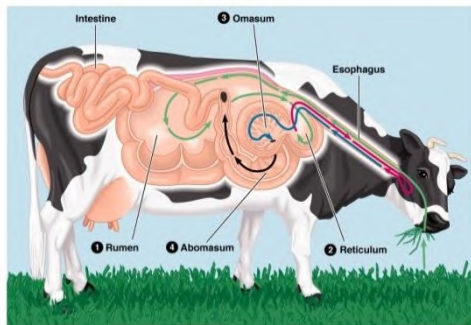
Limbah yang dihasilkan dari pemotongan sapi rata-rata mencapai 40 ton limbah padat meliputi rumput sisa pakan, kotoran sapi dan isi rumen sedangkan limbah cair kurang lebih 300 m³ setiap hari (Padmono, 2005; Ratnawati & Trihadiningrum, 2014). RPH Pegirian memiliki 300 ekor sapi (dipotong 150 ekor dan di kandang 150 ekor). Limbah padat yang dihasilkan masih dibuang langsung ke TPA Benowo atau dibiarkan di tempat terbuka untuk dikeringkan (Padmono, 2005; Rahmawati, 2013).

Analisa komposisi limbah rumen RPH telah dilakukan oleh Rahmawati (2013). Parameter yang diukur menunjukkan nilai tertinggi adalah serat kasar, protein, nitrogen C/N ratio dan lemak. Rasio C/N dari rumen di RPH Pegirian sebesar 11,42 (Rahmawati, 2013) sedangkan rasio C/N rumen dari limbah RPH Cakung 17-21, kadar Lemak pada rumen sebesar 15-31 g/kg. Karbon digunakan mikroba sebagai sumber energi dan nitrogen digunakan untuk pertumbuhan mikroba (Padmono, 2005).

Limbah RPH di Chennai, India dimanfaatkan oleh Ramani *et al.* (2010) untuk produksi lipase dengan substrat dari lemak kambing. Isolat yang digunakan untuk produksi adalah *Pseudomonas gessardii*, aktivitas spesifik lipase yang dihasilkan yang cukup besar yaitu 1.473 U/mg (Ramani *et al.*, 2010).

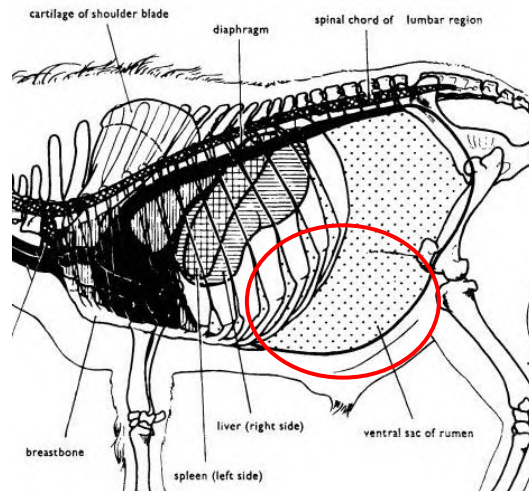
2.2 Organ *Visceral* Ruminansia

Organ *visceral* merupakan organ dalam rongga perut yang memiliki peranan penting dalam metabolisme dan pembentukan energi (Kozloski, *et al.*, 2001; Moran, 2005). Organ *visceral* bertanggung jawab dalam pengeluaran lebih 50% panas tubuh ruminansia (Anugwa, 1989). Akumulasi lipid terjadi di organ *visceral* dan jaringan subkutan (Dodson *et al.*, 2010). Organ pencernaan dalam rongga perut (*visceral*) adalah retikulum, omasum, abomasum, rumen dan *intestinum* (Moran, 2005). Selain itu yang termasuk organ *visceral* adalah hati, jantung, paru-paru dan ginjal (Fitzsimons *et al.*, 2014). Metabolisme lipid terjadi selama proses pencernaan, lipid akan dihidrolisis menjadi digliserol, monogliserol oleh lipase yang dihasilkan oleh pankreas (Drackley, 2000; Akter, 2011). Gambar 2.1 menjelaskan organ dalam perut sapi.

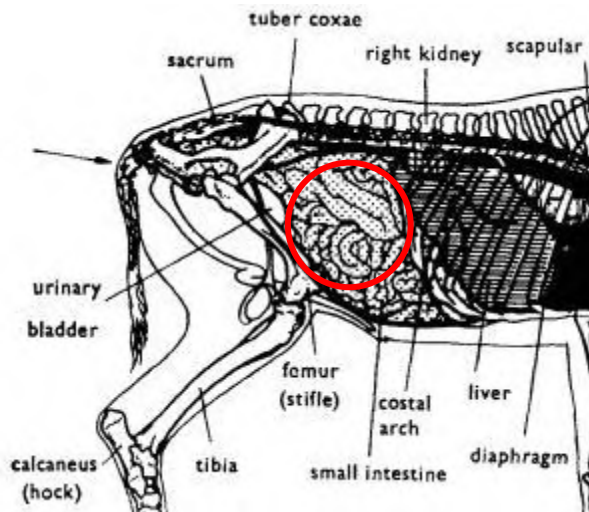


Gambar 2.1 Organ Perncernaan dalam Abdomen Sapi

Pola konsumsi masyarakat terhadap organ *visceral* kini mengalami pergeseran yang mengakibatkan *intestinum* dan rumen tidak banyak dikonsumsi, sehingga kini menjadi limbah. Organ *visceral* yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah rumen yang ditunjukkan dalam Gambar 2.2 dan *intestinum* yang ditunjukkan dalam Gambar 2.2 (Hofmann & Scholz, 1968).



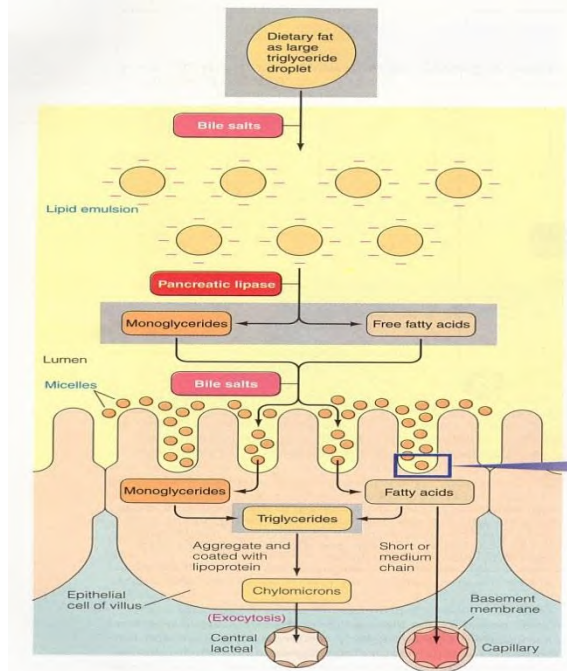
Gambar 2.2. Bagian Rumen yang Digunakan sebagai Substrat



Gambar 2.3. Bagian *Intestinum* yang Digunakan sebagai Substrat

2.3 Mekanisme Transfer dan Penyerapan Lipid pada Ruminansia

Makanan yang tidak larut dalam air di dalamnya mengandung triasilgliserol. Triasilgliserol tersebut akan dirubah menjadi misel oleh garam empedu. Enzim lipase pankreas akan merubah trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol sehingga dapat diserap oleh mukosa usus. Kemudian di dalam mukosa usus, asam lemak dan gliserol tersebut akan disintesis kembali menjadi trigliserida (Bauchart, 1992; Moran, 2005). Gambar 2.4 menjelaskan proses penyerapan lipid.



Gambar 2.4 Mekanisme Penyerapan Lipid secara Difusi

Pemecahan lipid pada hewan ruminansia mulai terjadi pada retikulus. Penyerapan asam lemak pada abomasum dan retikulum sangat sedikit (Bauchart, 1992). Asam lemak akan diserap oleh usus halus (*small intestine*). Perbedaan konsentrasi

pada membran mukosa usus halus dipengaruhi dengan dua cara (1) Kehadiran protein pengikat asam lemak yang segera mengikat asam lemak memasuki sel epitel. (2) Esterifikasi kembali asam lemak menjadi monogliserida (produk utama pencernaan yang melintasi mukosa usus halus) (Drackley, 2000).

Absorpsi lipid terutama terjadi dalam *jejunum*, bagian tengah usus halus. Hasil pencernaan lipid (gliserol, asam lemak rantai pendek, asam lemak rantai sedang, asam lemak rantai panjang, monogliserida, trigliserida, kolesterol dan fosfolipid) diabsorpsi ke dalam membran mukosa usus halus dengan cara difusi (Gambar 2.2)(Guyton & Hall, 2006). Setelah masuk ke dalam sel epitel, monogliserida dihidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak oleh lipase sel epitel. Kemudian asam lemak bebas diubah oleh retikulum endoplasma menjadi trigliserida kembali. Trigliserida dalam sel epitel terkumpul dalam butiran dengan kolesterol dan fosfolipid yang diabsorpsi dan posfolipid yang baru disintesis (Bauchart, 1992; Drackley, 2000).

2.4 Miroorganisme Lipolitik

Lipid merupakan makromolekul organik nonpolar yang bersifat hidrofobik dan ampifilik yang membentk struktur seperti vesikel, liposom atau membran dalam lingkungan basah (Dashty, 2014). Lipid dipecah menjadi molekul lebih sederhana oleh lipase dengan menghidrolisis trigliserida menjadi digliserid, monogliserida, asam lemak bebas dan gliserol (Houde *et al.*, 2004).

Mikroorganisme lipolitik mempunyai kemampuan menghasilkan enzim lipolitik (lipase, esterase) dan menyeleksi aktivitas hidrolitik terhadap lipid yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan asam lemak (Setyati & Subagiyo, 2012). Mikroorganisme lipolitik diisolasi dari rumen, limbah perairan dan tanah yang mengandung minyak zaitun dan kulit lobster *Panlirus homarus* (Balckburn & Hobson, 1960; Etruğul *et al.*, 2007; Papanikolau *et al.*, 2011; Ülker *et al.*, 2011; Selvamohan *et al.*, 2012).

Mikroorganisme yang mampu memproduksi lipase adalah dari kelompok *yeast*, fungi dan bakteri. Lipase yang dihasilkan mikroorganisme memiliki kualitas yang tinggi, biaya produksi rendah dan waktu yang dibutuhkan untuk produksi lebih cepat (Padmapriya *et al.*, 2011). Kelompok *yeast* yang mampu memproduksi lipase adalah *Candida rugosa*, *C. antarctica*, *C. viswanathii*, kelompok fungi *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp., (Gunasekaran & Das, 2005; Vakhlu & Kour, 2006; Mohan *et al.*, 2008; Papanikolaou *et al.*, 2011; Bayoumi *et al.*, 2012; de Almeida *et al.*, 2013).

Strain bakteri memiliki potensi yang lebih besar untuk memproduksi lipase karena aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya (Ramani *et al.*, 2010; Bayoumi *et al.*, 2012). Lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. menarik untuk diteliti karena memiliki *sequence* protein yang unik (Kim *et al.*, 2002). Urutan nukleotida *open reading frame* (bagian yang membuka ketika awal proses replikasi) pada urutan basa ke 648 bp mengkode polipeptida 215 residu asam amino. Jadi bagian start kodon ATG pada posisi 1 diduga merupakan ribosom binding site (rbs) dan terdapat *sequence* promotor -35 dan -10. Sinyal *sequence* asam amino 34 dan sisi pelekukan antara Ala34 dan Ala35 ditentukan dari *sequence* protein lipase N-terminal. Sehingga dapat disimpulkan *sequence* lipase terdiri dari 181 asam amino dengan berat molekul (*Mr*) 19,225 (Kim *et al.*, 2002).

2.5 *Bacillus* sp.

Bakteri memiliki peranan penting dalam degradasi senyawa organik di alam. Salah satu genus yang berpotensi untuk mendegradasi makromolekul nonpolar berupa lipid adalah *Bacillus* sp. (Kamijo *et al.*, 2011). Genus *Bacillus* merupakan kelompok bakteri Gram-positif berbentuk *rod-shape* (Gambar 2.5) yang mensekresikan enzimnya ke luar sel sehingga disebut ekstraseluler enzim karena tidak melibatkan lisis sel dalam sekresi enzim (Okafor, 2007, Økstad & Kolstø, 2011). Genus

Bacillus dapat tumbuh dengan baik di berbagai macam sumber karbon (Madigan *et al.*, 2012).



Gambar 2.5 Morfologi *B. cereus* ATCC 10987

Bacillus memiliki potensi untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi karena karakternya yang mampu hidup pada kisaran suhu yang luas, membentuk spora, kosmopolit, tahan terhadap senyawa-senyawa antiseptik, bersifat aerob atau fakultatif anaerob, memiliki kemampuan enzimatik yang beragam (Madigan *et al.*, 2012). Gen *lipA* pada *Bacillus* sp. mengkodekan sekresi lipase (Kamijo *et al.*, 2011). Adapun klasifikasi *Bacillus* spp. menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Breed *et al.*, 1957) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
 Divisio : Firmicutes
 Classis : Bacilli
 Ordo : Bacillales
 Familia : Bacillaceae
 Genus : *Bacillus*
 Species : *Bacillus* spp.

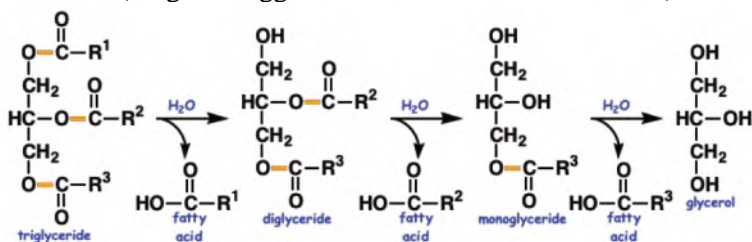
Produksi lipase oleh *Bacillus* sp. yang diisolasi dari kulit Lobster *Panlirus homarus* telah dilakukan oleh Selvamohan (2012) dengan produksi maksimum lipase dan jumlah paranitrophenyl palmitate tercatat sebanyak 0.89 µg/ml/min. Isolat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari limbah pabrik minyak zaitun mengindikasikan substrat pertumbuhannya memiliki komponen utama berupa lipid (Etruğul *et al.*, 2007). *B. pumilus* yang diisolasi dari tanah tercemar dan ditumbuhkan dalam substrat *tributyryn* dapat memproduksi lipase dengan aktivitas sampai

3.526,6 U/mg (Rakesh Kumar *et al.*, 2012). *Bacillus* sp. yang diisolasi dari sedimen estuaria dapat membentuk zona bening maksimum berdiameter 9,8 mm dan aktivitas *crude enzyme* lipase spesifik sebesar 86,15 U/mg. Purifikasi lipase dengan ammonium sulfat 60% merupakan paling efektif dengan aktivitas spesifik maksimum yaitu 60,97 U/mg (Muthazhagan & Thangaraj, 2014).

2.6 Lipase

Lipase atau *triacylglycerol acylhydrolases* (EC3.1.1.3) termasuk dalam kelas enzim yang mengkatalisis hidrolisis trigliserida rantai panjang dan merupakan kelompok yang paling penting dari biokatalisis untuk aplikasi bioteknologi (Joseph *et al.*, 2007). Lipase dapat larut dalam air dan bekerja sebagai katalis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut dalam air (Bornscheuer *et al.*, 2002; Rakesh Kumar *et al.*, 2012).

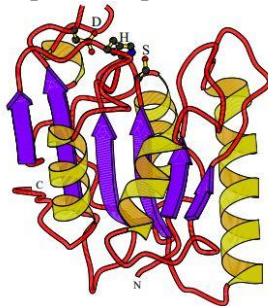
Fungsi alami lipase adalah menghidrolisis trigliserida menjadi digliserid, monogliserida, asam lemak bebas dan gliserol (Gambar 2.6) (Houde *et al.*, 2004; Bora & Bora, 2012). Selain hidrolisis, lipase mampu mengkatalisis berbagai macam reaksi lain seperti: inter-esterifikasi, alkoholisis, asidolisis, esterifikasi dan aminolisis (Jaeger & Eggert, 2002; Vakhlu & Kour, 2006).



Gambar 2.6 Hidrolisis Trigliserida menjadi Asam Lemak dan Gliserol

Struktur 3D lipase yang dihasilkan *B. subtilis* memiliki bentuk globular dengan dimensi 35Å × 36Å × 42 Å (Gambar 2.7) (van Pouderoyen *et al.*, 2001). *Active site* α/β hydrolase fold enzim terdiri dari tiga katalitik residu: residu nukleofilik (serin, sistein, atau aspartat), asam katalitik residu (aspartat atau

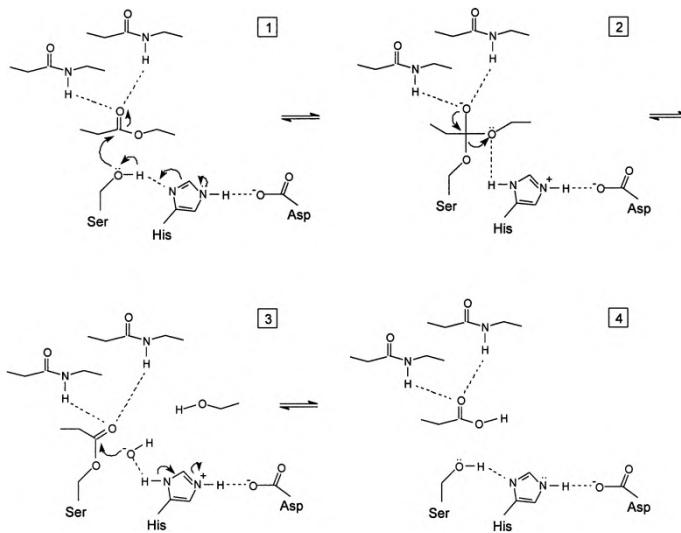
glutamat), dan residu histidin, konsisten di urutan asam amino. Lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. memiliki berat molekul 19,6 kDa (Jaeger *et al.*, 1999). Berat molekul lipase oleh *Bacillus* sp. berbeda-beda yaitu 62,2 kDa (Rakesh Kumar, *et al.*, 2012), 54 kDa (Muthazhagan & Thangaraj, 2014) dan 43 kDa (Shariff *et al.*, 2011). Berat molekul lipase antara 15-75 kDa (Padilha *et al.*, 2012). Saxena *et al.* (2003) menjelaskan bahwa berat molekul dapat dipengaruhi oleh prosedur purifikasi enzim.



Gambar 2.7. Struktur 3D Lipase *B. subtilis*

2.7 Mekanisme Katalisis Enzim Lipase

Lipase merupakan serin hirolase yang mengandung *sequens* G-X₁-S-X₂-G sebagai agen katalitik, G *glycine*, S *serine*, X₁ *histidine* dan X₂ asam glutamat atau aspartat (Saxena *et al.*, 2003). Lipase bertindak atas obligasi ester karboksil yang memecah *acylglycerols* menjadi asam lemak dan gliserol (Jaeger *et al.* 1999). Mekanisme reaksi lipase terjadi dalam 2 proses (Gambar 2.7).



Gambar 2.8 Mekanisme Reaksi Lipase

Mekanisme reaksi lipase dari Gambar 2.8 adalah sebagai berikut [1] Pengikatan lipid, aktivasi nukleofilik serin residu oleh histidin dan pengikatan nukleofilik dari substrat atom karbon karbonil oleh Ser O⁻. [2] *Transient tetrahedral* terbentuk, O⁻ distabilkan oleh interaksi dengan dua peptida NH. Histidin menyumbangkan proton agar ikatan gugus alkohol terlepas dari substrat. [3] Ikatan kovalen menengah ("enzim *acyl*"), di mana komponen asam dari substrat diesterifikasi untuk residu serin. Molekul air yang masuk diaktifkan oleh residu histidin dan ion hidroksil yang dihasilkan melakukan pengikatan nukleofilik pada atom karbon karbonil dari kovalen. [4] Residu histidin menyumbangkan proton pada atom oksigen dari residu serin aktif, ikatan ester antara serin dan komponen *acyl* terdegradasi, sehingga *acyl* terlepas (Jaeger *et al.* 1999).

2.8 Optimasi Substrat dalam Produksi Enzim Lipase

Produksi ekstraseluler enzim oleh mikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor, misalnya faktor fisik yaitu suhu dan pH serta kandungan nutrisi dalam komposisi medium pertumbuhan.

Faktor terbesar yang mempengaruhi ekspresi aktivitas lipase adalah sumber karbon. Lipase dapat diproduksi apabila medium yang digunakan mengandung lipid yaitu minyak atau *inducer* lain seperti *triacylglycerols*, asam lemak dan *glycerol* (Sharma *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2004). Sumber karbon dari lipid menghasilkan lipase dalam jumlah yang besar. Sumber nitrogen dan mikronutrien esensial lainnya tetap diperhatikan untuk pertumbuhan dan optimasi produksi. Nutrisi dibutuhkan untuk pertumbuhan dapat dibuat secara sintetik (*synthetic medium*) seperti glukosa, minyak dan komponen kompleks seperti pepton, *yeast extract* (Treichel *et al.*, 2010)

Penelitian mengenai produksi lipase oleh *Bacillus* sp. dilakukan oleh Selvamohan *et al.* (2012) dengan menggunakan variasi substrat yaitu gliserol, minyak zaitun dan minyak kelapa. Penelitian variasi sumber karbon dan nitrogen telah dilakukan oleh Bonala dan Magamoori (2012), sumber lipid yang digunakan minyak zaitun, minyak kelapa dan minyak kacang tanah. Sumber karbon berupa glukosa, sukrosa, maltosa, laktosa dan pati. Sumber nitrogen yang digunakan *tryptone*, *Ammonium sulphate*, *beef extract*, *yeast extract*, *Soya bean Meal*. Strain menghasilkan aktivitas enzim maksimum dan aktivitas lipase sebesar 150 U/ml dengan menggunakan medium dengan komposisi medium 1% laktosa, lipid dari minyak kacang tanah dan tripton sebagai sumber nitrogen. Selain itu, penelitian lain menjelaskan bahwa sumber lipid dari limbah RPH telah digunakan untuk produksi lipase yaitu lemak kambing, dilakukan variasi konsentrasi substrat dalam medium yaitu 0.11, 0.21, 0.31, 0.42 dan 0.52 g/100 ml dalam basal medium. Aktivitas tertinggi lipase dihasilkan 156 U/mL dan konsentrasi optimum substrat adalah 0,31% (Ramani *et al.*, 2010).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2015 hingga Mei 2016 di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, FMIPA, ITS Surabaya. Selain itu, penelitian juga dilakukan di laboratorium Hepatitis dan laboratotium Gastroenteritis *Tropical Disease Center*, Universitas Airlangga.

3.2 Metode yang Digunakan

Langkah kerja penelitian ini diawali dengan persiapan medium peremajaan *Bacillus* sp. SK II-5. Setelah dilakukan peremajaan, dilanjutkan dengan pengujian kualitatif *Bacillus* sp. SK II-5 sebagai bakteri lipolitik menggunakan medium Tween80 agar (Kumar *et al.*, 2012). Dilanjutkan dengan pemisahan lemak dari jaringan organ visceral, lemak hasil pemisahan ditimbang berat dan diukur kadar C, N dan H (Ramani *et al.*, 2010). Selanjutnya persiapan media aklimatisasi dan fermentasi. Kemudian, dilakukan optimasi substrat produksi menggunakan lemak *intestinum* dan *rumen* sapi dengan variasi konsentrasi untuk mengetahui aktivitas enzim yang tertinggi. Selanjutnya kurva pertumbuhan *Bacillus* sp. SKII-5 dibuat untuk mengetahui waktu isolasi lipase yang tepat.

Selanjutnya, produksi lipase menggunakan substrat *intestinum* 0,11% dan lemak *rumen* 0,21% dalam fermentasi cair dengan lama inkubasi mengacu pada profil pertumbuhan *Bacillus* sp. SKII-5 dalam tahap sebelumnya. Kemudian, dilakukan isolasi lipase dengan metode sentrifugasi dan diikuti dengan uji aktivitas lipase (Ertruğul *et al.*, 2007). *Crude* enzim dipurifikasi dengan metode presipitasi ammonium sulfat (Doung-Ly & Gabelli, 2014), selanjutnya dilakukan uji kandungan protein (Bradford, 1976), titik isoelektrik dan elektroforesis SDS-PAGE untuk mengetahui karakteristik lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. SK II-5.

Metode penelitian ditunjukkan dalam skema kerja di Lampiran 1.

3.2.1 Mikroorganisme

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan *Bacillus* sp. SK II-5 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, FMIPA, ITS.

3.2.1.1 Peremajaan *Bacillus* sp. SKII-5

Isolat murni *Bacillus* sp. SKII-5 dari stok murni ditumbuhkan pada medium NA (*Nutrient Agar*) dalam cawan Petri. Inokulasi isolat murni *Bacillus* sp. SKII-5 dilakukan menggunakan jarum ose secara aseptis. Kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 2x24 jam hingga tumbuh koloni bakteri. Setelah itu, isolat disimpan dalam lemari pendingin dan diremajakan setiap 2 minggu. *Bacillus* sp. SK II-5 yang telah berumur dua hari diremajakan pada Erlenmeyer yang berisi 100 ml medium NB sebanyak tiga ose.

3.2.1.2 Pengujian Kualitatif Bakteri Lipolitik

Kemampuan *Bacillus* sp. SKII-5 untuk menghasilkan hidrolisis lemak diuji dengan menggunakan media Tween80 agar (Kumar *et al.*, 2012). Medium pertumbuhan bakteri lipolitik memiliki komposisi (g/L): peptone, 10; NaCl, 5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1; agar-agar, 20; tween 80, 10 mL dan aquades. Seluruh bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Medium distrerilkan pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1,5 atm dengan menggunakan autoklaf. Medium steril dituang ke cawan Petri dalam kondisi steril dan ditunggu hingga memadat. Isolat *Bacillus* sp. SK II-5 diinokulasikan dalam media dengan metode streak. Kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Aktivitas lipolitik dari *Bacillus* sp. SK II-5 ditentukan oleh diameter zona bening yang terbentuk di sekitar tumbuhnya koloni (Bonala dan Mangamoori, 2012).

3.2.1.3 Pembuatan starter *Bacillus* sp. SKII-5

Inokulum yang diinokulasikan ke dalam medium aklimatisasi adalah inokulum yang berada pada fase eksponensial berdasarkan kurva pertumbuhan sel yaitu pada 18 jam (Atmaja, 2015). Isolat *Bacillus* sp SK II-5 sebanyak 10 ml yang dalam medium NB diinokulasikan pada medium aklimatisasi. Lalu, diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang (Madigan *et al.*, 2012). Pada jam ke 18 pertumbuhan bakteri pada medium aklimatisasi yang terukur oleh nilai *Optical Density* diukur dengan spektrofotometer sudah mencapai nilai 0,6-0,8, maka isolat dapat dipindahkan ke dalam medium fermentasi untuk digunakan sebagai *starter*.

3.2.1.4 Kurva Pertumbuhan *Bacillus* sp. SKII-5 dalam Media Produksi

Inokulum *starter* sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang telah berisi 90 mL medium Fermentasi (Lampiran 2). Pertumbuhan bakteri diamati setiap 2 jam selama 48 jam. Pengamatan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm (Madigan *et al.*, 2012).

3.2.2 Preparasi Media

3.2.2.1 Persiapan Media Kultur

Medium yang digunakan untuk kultur dan peremajaan isolat *Bacillus* sp. SK II-5 adalah *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB). Pembuatan *Nutrient Agar* adalah sebagai berikut, 8 gram serbuk NA dilarutkan dalam 1 liter aquades kemudian dipanaskan hingga suhu 60°C sambil diaduk diatas *magnetic stirrer* sampai larut. Setelah homogen, Erlenmeyer ditutup dengan sumbat dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. NA steril dituang pada cawan Petri dan dibiarkan memadat.

Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB). Tiga belas gram *Nutrient Broth* (NB) dilarutkan dalam 1 liter akuades dalam Erlenmeyer dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk

diatas *magnetic stirrer* sampai larut. Setelah homogen, NB dimasukkan ditutup dengan sumbat dan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm (Prescott, 2002).

3.2.2.2 Persiapan Media Aklimatisasi

Substrat untuk media aklimatisasi dan fermentasi menggunakan organ *visceral* sapi yang diambil dari rumah potong hewan Pegirian Surabaya.

Media aklimatisasi digunakan untuk membiasakan *Bacillus* sp. tumbuh dalam media yang mengandung lipid sebagai sumber karbon. Lipid yang digunakan berasal dari *intestinum* dan *rumen*. Pembuatan sumber lipid diawali dengan mempersiapkan limbah *intestinum* dan *rumen* sebanyak 1 kg. Limbah dibersihkan terlebih dahulu menggunakan air mengalir. Selanjutnya, limbah *intestinum* dan *rumen* dioven dengan suhu 110°C selama 10 jam (Ramani *et al.*, 2010). Lipid yang keluar dari jaringan dimasukkan dalam botol steril.

Pembuatan medium aklimatisasi, disiapkan 1 gram lemak *intestinum* dan *rumen*. Kemudian ditambahkan 6,5 gr medium NB dan akuades ditambahkan hingga 1 liter. Medium selanjutnya dipanaskan hingga suhu 100°C sambil diaduk diatas *magnetic stirrer*. Kemudian ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

3.2.2.3 Persiapan Media Fermentasi

Komposisi medium fermentasi berdasarkan Sharma *et al.* (2014) dengan sedikit modifikasi. Medium produksi terdiri atas basal medium yaitu peptone (0,05%); KH_2PO_4 (0,1%); K_2HPO_4 (0,3%); Na_2SO_4 (0,2%); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%); gum arab (0,1%); tween80 (0,1%); pH 7.0, serta ditambahkan konsentrasi substrat lemak *intestinum* dan *rumen* yang dibuat bervariasi 0,11%, 0,21%, 0,31% dan 0,42% (w/v) (Ramani *et al.*, 2010). Medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

3.2.3 Produksi Lipase

Bacillus sp. SK II-5 sebanyak 10% (v/v) dari starter ditumbuhkan dalam medium fermentasi (Lampiran 2) sebanyak 90 ml di dalam Erlenmeyer ukuran 250 ml. Kultur *Bacillus* sp. diinkubasi dalam suhu ruang dan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 40 jam (Rajendran & Thangavelu, 2012). Biomassa dalam *Broth* Medium dipisahkan dengan menggunakan filtrasi dengan kertas Wattman No. 1, biomassa yang masih tersisa di pisahkan dengan metode sentrifugasi kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit dalam suhu 4°C (Ertruğul *et al.*, 2007). Natan digunakan untuk mengukur aktivitas lipase (Ramani, *et al.*, 2010).

3.2.4 Purifikasi Lipase

Purifikasi enzim lipase menggunakan metode presipitasi enzim dengan penambahan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ menurut metode Doung-Ly & Gabelli (2014). Penambahan garam ammonium sulfat menyebabkan *salting out* dimana terjadi penarikan air dari koloid protein akibat perubahan muatan listrik disekitar protein. Peristiwa ini menyebabkan interaksi hidrofobik diantara protein dan menurunkan kelarutan protein sehingga protein termasuk protein enzim mengendap. Ekstrak kasar enzim lipase dimurnikan dengan cara pengendapan bertahap ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan fraksi 0-30%, 30%-45%, 45%-60%, 60%-75% dan 75-90%. Berikut ini merupakan langkah-langkah presipitasi amonium sulfat

a. Pengendapan 0-30%

Ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebanyak 2,46 g ditimbang, selanjutnya dilarutkan ke dalam 15 ml *crude* lipase dalam gelas beaker 50 ml. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit dan dihomogenkan. Kemudian dibiarkan *overnight*. Endapan protein dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 14.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Sehingga dihasilkan supernatan I dan natan I (Doung-Ly & Gabelli, 2014).

b. Pengendapan 30-45%

Supernatan I dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 ml kemudian ditambah dengan 1,118 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit dan dihomogenkan. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ larut kemudian dibiarkan *overnight*. Endapan protein dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 14.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Sehingga dihasilkan supernatan II dan natan II (Doung-Ly & Gabelli, 2014)..

c. Pengendapan 45-60%

Supernatan II dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 ml kemudian ditambah dengan 1,125 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit dan dihomogenkan. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan *overnight*. Endapan protein dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 14.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Sehingga dihasilkan supernatan III dan natan III (Doung-Ly & Gabelli, 2014).

d. Pengendapan 60-75 %

Supernatan III dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 ml kemudian ditambah dengan 0,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit dan dihomogenkan. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ larut kemudian dibiarkan *overnight*. Endapan protein dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3500 rpm, pada suhu 4°C selama 30 menit. Sehingga dihasilkan supernatan IV dan natan IV (Doung-Ly & Gabelli, 2014).

e. Pengendapan 75-90 %

Supernatan IV dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 ml kemudian ditambah dengan 1,06 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit dan dihomogenkan. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ larut kemudian dibiarkan *overnight*. Endapan protein dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 14.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Sehingga dihasilkan supernatan V dan natan V. Setiap natan pada masing-masing fraksi digunakan untuk uji aktivitas enzim dan uji kandungan protein (Doung-Ly & Gabelli, 2014).

3.2.5 Uji Aktivitas Lipase

3.2.5.1 Pembuatan Kurva Standart 4-Nitrophenol

Kurva standart 4-Nitrophenol dibuat dengan melarutkan 4-Nitrophenol dengan aquades. Kemudian dibuat konsentrasi 0 hingga 1500 μM . Selanjutnya, larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 410 nm (Sigma-Aldrich, 2013). Blanko yang digunakan adalah aquades. Nilai yang diperoleh dibuat grafik dengan persamaan $Y = ax + b$, dimana Y adalah nilai absorbansi dan x adalah nilai konsentrasi (μM) 4-Nitrophenol.

3.2.5.2 Pengujian Aktivitas Lipase

Aktivitas lipase diukur menggunakan *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) sebagai substrat. Kurva standart yang digunakan adalah 4-nitrophenol. Indikator warna yang muncul adalah kuning-oranye. Buffer Tris-HCl pH 8 dibuat sebelum dilakukan pengujian (Lampiran 3). Persiapan substrat menggunakan larutan A (30 mg *p*NPP dilarutkan dalam 10 ml isopropanol) dimasukkan ke dalam 90 ml larutan B (0,1 gram Gum Arabic dan 0,4 ml Triton X-100 dilarutkan dalam 50 mM buffer Tris-HCl pH 8.0), semua bahan diaduk hingga larut seluruhnya dengan volume akhir sebanyak 100 ml (Ertruğul *et al.*, 2007). Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mencampurkan 1,8 ml larutan substrat dan 0,2 ml crude enzim dan diinkubasi dalam suhu $30 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang λ 410 nm. Aktivitas per unit (U) ditunjukkan dalam μmol *p*-nitrophenol per menit dalam kondisi perlakuan (Sharma, *et al.*, 2014).

3.2.6 Uji Kandungan Protein

3.2.6.1 Pembuatan Pereaksi Bradford

Untuk membuat pereaksi Bradford, sebanyak 100 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* dilarutkan dalam 50 ml etanol 95%, tambahkan 100 ml 85% (w/v) asam fosfat. Encerkan sampai

warna melarut semua dan saring menggunakan kertas saring Whatman No.1 hingga volume 1 L, sehingga didapatkan konsentrasi 0,01% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 4,7% (w/v) etanol, dan 8,5% (w/v) asam fosfor (Bradford, 1976).

3.2.6.2 Pembuatan Kurva Standart BSA

Konsentrasi protein diukur dengan menggunakan standar protein Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 0,1 hingga 1 mg/ml. pada gelombang spektrofotometer 595 nm (Putranto, 2006). Pembuatan larutan standar yaitu dengan melarutkan 100 mg *Bovine Serum Albumin* (BSA) dilarutkan dalam 50 ml akuades. Larutan dikocok secara perlahan dan jangan sampai berbusa. Setelah homogen ditambah akuades hingga volume 1000 ml. Konsentrasi akhir larutan standar adalah 1 mg/ml BSA. Larutan standar sebanyak 40 µl dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan bradford sebanyak 2 ml. Larutan divortek dan dibiarkan selama 5 menit. Larutan kemudian diukur serapannya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Blanko diperlakukan seperti sampel namun larutan standar diganti dengan akuades. Nilai yang diperoleh dibuat grafik dengan persamaan $Y = ax + b$, dimana Y adalah nilai absorbansi dan x adalah nilai konsentrasi protein.

3.2.6.3 Pengujian Kandungan Protein

Pengukuran konsentrasi sampel dilakukan dengan cara mereaksikan 100 µl larutan sampel enzim dengan larutan bradford sebanyak 5 ml, divortex dan di inkubasi dalam suhu ruang dalam kondisi gelap selama 2 menit. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang 595 nm (Bradford, 1976). Nilai absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam kurva standar untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel enzim.

3.2.7 Titik Isoelektrik

Penentuan titik isoelektrik adalah sebanyak 6 tabung reaksi bersih dan kering disiapkan, lalu dimasukkan 1 ml lipase pada tiap-tiap tabung. Pada setiap tabung ditambahkan 1 ml larutan buffer asetat masing-masing dari pH 3,4,5,6,7 dan 8. Kemudian dikocok, lalu dicatat derajat kekeruhannya setelah 10, 20, dan 30 menit. Diamati hasilnya. Diamati berapa tabung yang terbentuk maksimal. Selanjutnya semua tabung dipanaskan diatas penangas air. Diamati hasilnya. Pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik (Burgess dan Thomson, 2002).

3.2.8 Pengukuran Berat Molekul Lipase menggunakan SDS-PAGE

Karakterisasi dengan SDS PAGE merupakan metode analisis bobot molekul dari protein yang disesuaikan dengan marker standar sehingga dapat diketahui bobot yang sesuai. Proses SDS PAGE melalui tahapan perakitan chamber dan *glass plate*, preparasi sampel, dan proses *running* SDS PAGE. Perakitan *chamber* dilakukan dengan memasukkan *glass plate* yang telah diberi *spacer* pada sisi kanan dan kiri pada *chamber*. Gel poliakrilamid yang dibuat terdiri dari *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4% (Rakesh Kumar *et al.*, 2012). Bahan yang digunakan dalam *Separating (resolving)* Gel 12% adalah 30% Acrylamide/bis (6 ml); 1,5M Tris-HCl pH 8,8 (3,75 mL); 10% SDS (150 μ L); diH₂O (5,03 μ L); TEMED (7,5 μ L); dan 10% APS (75 μ L). Total volume 15 mL (Bio-Rad Protocol, 2015)

Bahan yang digunakan dalam *Stacking gel* 4% adalah 30% Acrylamide/bis (1,98 mL) ; 0,5M Tris-HCl pH 8,8 (3,78 mL); 10% SDS (150 μ L); diH₂O (9 μ L); TEMED (15 μ L); 10% APS (75 μ L). Total volume 15 mL (Bio-Rad Protocol, 2015). *Stacking Gel* yang belum memadat diberi *comb* (sisir) yang berfungsi untuk membentuk sumuran (*well*). *Comb* dicabut stelak lurus agar sumur tidak rusak.

Running SDS PAGE dilakukan selama 70 menit dengan tegangan listrik 100 volt. Hasil dari *running* direndam dengan pewarnaan *Commasie Brilliant Blue* R-250 selama 20 menit untuk proses pewarnaan pita pada gel. Gel dari hasil perendaman selanjutnya dimasukkan ke dalam air panas suhu 150°C untuk menghilangkan *commasie blue* yang masih tersisa pada gel.

3.2.9 Analisa Kadar (%) Karbon (C), Hidrogen (H) dan Nitrogen (N)

3.2.9.1 Penentuan C Metode *Walkey Black* (AOAC,1990)

Analisis kandungan C adalah sampel diambil 0,5 gram lemak, kemudian dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 500 mL. Larutan K_2CrO_7 1 N dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer sebanyak 10 mL dan 20 mL H_2SO_4 . Labu Erlenmeyer digoyang-goyangkan agar sampel dapat beraksi. Campuran sampel didinginkan selama 20-30 menit. Larutan tersebut diencerkan dengan aquades sebanyak 200 mL, ditambahkan 10 mL H_3PO_4 , dan 30 tetes indikator difenilamin. Larutan dititrasi dengan larutan $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 N melalui buret sampai terjadi perubahan warna dari hijau gelap menjadi biru kotor dan pada pada titik akhir warna berubah menjadi hijau terang.

a) Rumus perhitungan:

$$\% C = \frac{(me K_2Cr_2O_7 - me FeSO_4) \times 0,003 \times 1,3 \times 100\%}{BS}$$

Keterangan:

Me : N x V

N : Normalitas

V : Volume

BS : Berat sampel

0,003 : valensi Cr yang teroksidasi

3 x 0,001 (mg ke gram)

3.2.9.2 Penentuan H Total (Bvahan, 2004)

Metode yang digunakan untuk menentukan total H adalah dengan metode gravimetri. Lemak sebanyak 5 g diletakkan pada cawan timbang, kemudian dipindahkan dalam tabung Erlenmeyer. Selanjutnya, tabung Erlenmeyer ditutup dan timbang secara hati-hati, sehingga didapatkan m_1 (massa awal). Setelah ditimbang, penutup Erlenmeyer dibuka, dan dimasukkan pada oven dengan suhu 105°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, sampel dimasukkan dalam desikator supaya dingin. Kemudian, tabung Erlenmeyer ditutup kembali dan ditimbang, sehingga didapatkan m_2 (massa akhir).

Rumus perhitungan:

$$\% \text{ H} = 11,19 \times \frac{m_1 - m_2}{m \text{ sampel}}$$

Keterangan.

m_1 = massa awal (mg)

m_2 = massa akhir (mg)

m sampel = sampel yang diuji (mg)

3.2.9.3 Penentuan N Total Metode *Kjedhal* (AOAC,1990)

Metode Kjedhal terdiri dari tiga tahapan yaitu destruksi, detilasi, dan titrasi. Metode destruksi dilakukan dengan sampel lemak ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam labu Kjedahl dan ditambahkan 3 gram selen serta 30 mL H_2SO_4 pekat (catatan: untuk blanko tanpa sampel). Semua bahan didestruksi dalam labu Kjedahl di lemari asam pada suhu $200 - 250^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam dan hingga terjadi perubahan warna hijau. Hasil destruksi dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL dan ditambahkan akuades sampai batas tanda volume 250 mL. Larutan dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam labu didih sebanyak 25 mL.

Tahapan destilasi larutan dengan menambahkan NaOH sebanyak 30 mL dengan memasukkan kertas lakmus sebagai indikator perubahan warna menjadi basa. Hasil destilasi berupa

cairan NH_3 ditampung pada Erlenmeyer yang berisi asam borat dan indikator *conway*.

Tahapan titrasi dilakukan dengan menambahkan H_2SO_4 0,05 N sampai terjadi perubahan warna hijau menjadi merah muda. Sample pembuatan larutan blanko adalah aquades dengan melalui tahapan destruksi, destilasi, dan titrasi.

Rumus perhitungan:

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{mL titrasi sampel} - \text{mL titrasi blanko}) \times 0,512 \times 14}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

mL titrasi sampel : Volume Titrasi Sampel

mL titrasi blanko : Volume Titrasi Blanko

0,512 : Normalitas Asam Sulfat

14 : Nomor Atom Nitrogen.

3.3 Analisis Data

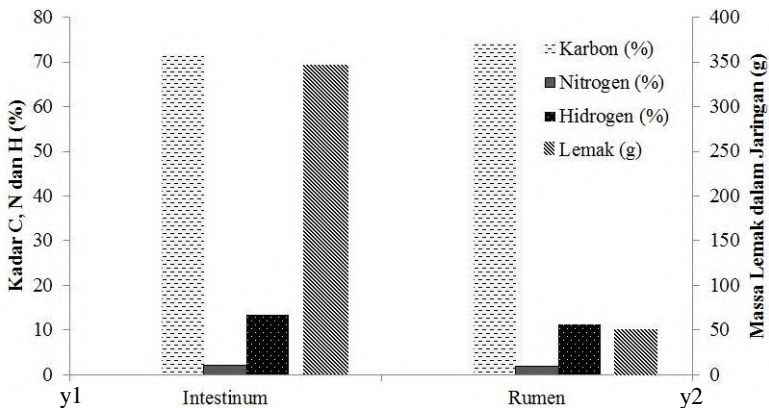
3.3.1 Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data

Data yang didapat berupa kandungan (%) C, N dan H dalam lemak, kurva pertumbuhan *Bacillus* sp. SKII-5 dalam lemak intestinum konsentrasi 0,11% dan lemak ruman konsentrasi 0,21%, aktivitas *crude* enzim dan hasil purifikasi, kandungan protein, titik isoelektrik dan berat molekul lipase. Data dibahas secara deskriptif kualitatif. Perhitungan aktivitas enzim dan kandunga protein dengan mengonversi absorbansi dari hasil spektrofotometer dengan menggunakan rumus kurva standart 4-nitrophenol (lampiran 4) dan Kurva standart BSA (Lampiran 5).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Optimasi Jenis Substrat terhadap Produksi Lipase

Substrat untuk produksi lipase adalah lemak yang telah dipisahkan dari jaringan intestinum dan rumen dengan kandungan masing-masing adalah 347,78 g dan 53,27 g dari 1 kg organ. Jumlah penyimpanan lemak dalam organ *visceral* dipengaruhi oleh tingkat metabolisme lipid selama proses pencernaan (Darckley, 2000). Pencernaan lemak di dalam rumen menghasilkan lebih dari 85% asam lemak yang kemudian berdifusi ke dalam mukosa intestinum dan teresterifikasi kembali menjadi trigliserida (TG) (Draper, 1982; Tisch, 2006).



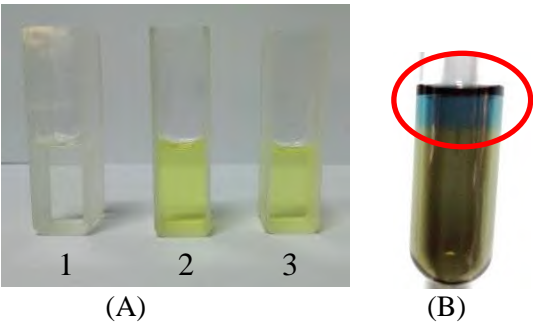
Gambar 4.1 Kadar (%) Karbon, Hidrogen dan Nitrogen dalam Lemak Intestinum dan Rumen (nilai diagram batang dibaca menggunakan sumbu axis y1), Berat Lemak Hasil Pemisahan dari Organ (nilai diagram batang dibaca menggunakan sumbu axis y2).

Pada Gambar 4.1 terlihat bahwa lemak intestinum dan rumen memiliki kandungan karbon mencapai 71,82% dan 74,58%, kandungan nitrogen sebesar 2,11% dan 1,86%, serta

kandungan hidrogen adalah 13,82% dan 11,55%. Karbon, hidrogen dan nitrogen merupakan makronutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri selama kultivasi (Schaechter, 2006; Anderson & Jayaraman *et al.*, 2003). Karbon dalam lemak dimanfaatkan oleh mikroba untuk pembentukan membran atau dinding sel, protoplasma dan produk simpanan. Kadar karbon yang terdapat dalam substrat dioksidasi menjadi CO₂ selama aktivitas metabolisme (Pitchel, 2005; Kim & Gadd, 2008). Kadar karbon lemak yang didapatkan dari intestinum dan rumen besar sehingga dapat dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber energi dan pembentukan sel.

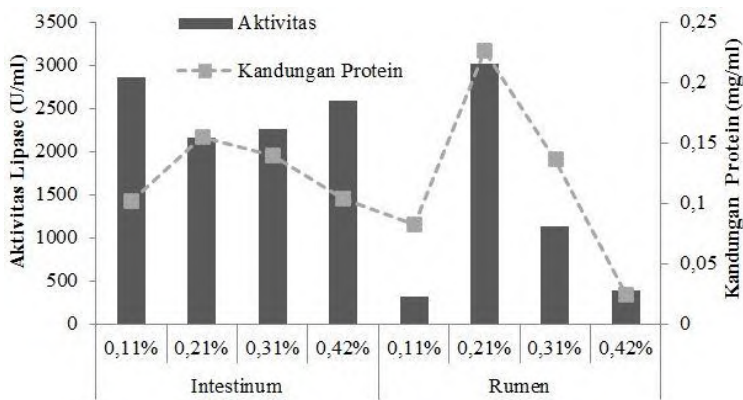
Kadar nitrogen dan hidrogen dalam lemak intestinum dan rumen relatif kecil. Nitrogen dan hidrogen digunakan oleh bakteri untuk sintesis protein, asam amino, dan asam nukleat di protoplasma (Pitchel, 2005) serta dimanfaatkan untuk pertumbuhan dan regulasi sel (Moat *et al.*, 2002). Menurut Pitchel (2002) dalam proses metabolisme bakteri, karbon lebih banyak dibutuhkan daripada nitrogen dan hidrogen.

Lemak yang didapatkan dari proses pemisahan dari organ intestinum dan rumen, diaplikasikan dalam produksi lipase oleh *Bacillus* sp. SKII-5 sebagai substrat dengan konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 0,11%; 0,21%; 0,31% dan 0,42 %. Aktivitas lipase tertinggi digunakan sebagai acuan untuk produksi dan karakterisasi lipase tahap selanjutnya. Aktivitas lipase diukur menggunakan substrat p-Nitrophenyl palmitate (pNPP). Lipase menghidrolisis ikatan ester dengan penyisipan molekul H₂O sehingga pNPP terpecah menjadi 4-Nitrophenol (pNP) dan palmitate. Substrat mengalami perubahan warna dari bening menjadi kuning. Warna kuning tersebut merupakan indikator pNP (Sharma *et al.*, 2014). Sedangkan kandungan protein diukur dengan menggunakan reagen Bradford. Komposisi utama reagen Bradford adalah *Commasie Brilliant Blue* G-250 yang memiliki gugus fungsi SO₃Na yang mampu berikatan dengan gugus amina pada asam amino, sehingga terbentuk warna biru (Bradford, 1976, Gorgiou *et al.*, 2008). Visualisasi dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 (A) Visualisasi aktivitas lipase terhadap substrat pNPP (1) pNPP+aquades (2 dan 3) pNPP+lipase. (B) Visualisasi reaksi kandungan protein.

Aktivitas tertinggi *crude* lipase dapat dilihat pada Gambar 4.3. Aktivitas lipase hasil produksi dengan menggunakan 0,21% rumen adalah 3009,3 U/ml dengan kandungan protein sebesar 0,220 mg/ml. Sedangkan aktivitas lipase dengan menggunakan substrat 0,11% intestinum adalah 2858,6 U/ml dan kandungan protein sebesar 0,102 mg/ml.



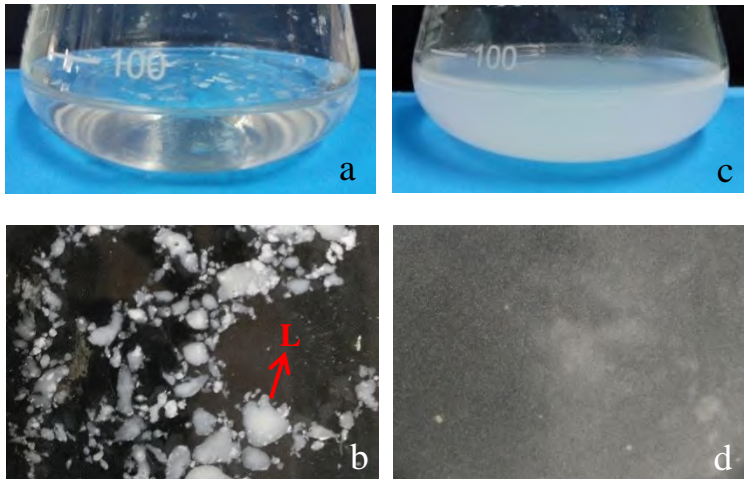
Gambar 4.3 Aktivitas dan Kandungan Protein *Crude* Lipase

Rata-rata Aktivitas lipase tertinggi dicapai oleh substrat lemak intestinum yaitu sebesar 2463,6 U/ml sedangkan rata-rata aktivitas lipase substrat rumen sebesar 1208 U/ml, hal ini kemungkinan disebabkan sebagian besar lemak yang terkandung dalam intestinum merupakan lipid berupa trigliserida (Nevin *et al.*, 1995). Kondisi ini memungkinkan bakteri lebih mudah untuk memecah trigliserida menjadi asam lemak, digliserida dan monogliserida serta gliserol dengan mensekresikan lipase untuk mendapatkan sumber karbon (Cai *et al.*, 2014). Sedangkan lemak yang terkandung di dalam rumen berupa asam lemak rantai pendek yang terakumulasi di dalam mukosa (Christie, 1981). Faktor utama dalam ekspresi aktivitas lipase adalah sumber karbon. Lipase merupakan enzim *inducible* yang memanfaatkan trigliserida dan asam lemak sebagai *inducer* (Treichel *et al.*, 2010).

4.2 Produksi dan Isolasi Lipase

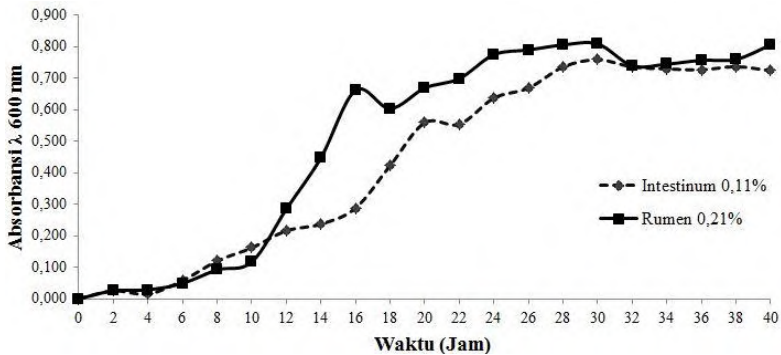
Produksi lipase dilakukan melalui teknik fermentasi oleh isolat *Bacillus* sp. SKII-5 pada medium produksi yang mengandung lemak intestinum 0,11 % dan rumen 0,21 %. Hal ini dikarenakan dua substrat tersebut menghasilkan lipase dengan aktivitas tertinggi. Lemak digunakan sebagai sumber karbon utama dalam produksi lipase (Sharma *et al.*, 2001).

Hasil fermentasi oleh isolat *Bacillus* sp. SKII-5 pada medium produksi menunjukkan adanya perubahan secara visual pada ukuran lemak padat. Sebelum proses fermentasi, ukuran lemak berukuran besar, dan ukurannya menjadi lebih kecil setelah proses fermentasi. Hal ini dikarenakan adanya pemecahan lemak menjadi produk (Toldrà *et al.*, 2007). Tampak pada Gambar 4.4, perubahan ini disertai dengan perubahan warna dan aroma medium produksi. Sebelum fermentasi, medium tidak berwarna (bening) Sedangkan setelah fermentasi, medium menjadi putih keruh yang disebabkan penambahan suspensi bakteri disebabkan adanya reaksi degradasi sumber karbon yang menghasilkan asam lemak bebas (Anderson & Jayaraman *et al.*, 2003).



Gambar 4.4 Visualisasi Medium Produksi Lipase (a) Sebelum Fermentasi (b) Permukaan Medium Sebelum Fermentasi (c) Setelah 40 Jam Fermentasi (d) Permukaan Medium Setelah 40 Jam Fermentasi. L adalah Lemak.

Waktu panen lipase dilakukan berdasarkan profil pertumbuhan *Bacillus* sp. SKII-5 pada medium lemak yang terdiri atas fase lag, eksponensial dan stasioner (Gambar 4.5). Isolasi lipase dilakukan ketika profil *Bacillus* sp. SKII-5 memasuki fase stasioner (pada jam ke-40) pada kedua substrat lemak yaitu 0,11% intestinum dan 0,21% rumen.



Gambar 4.5 Kurva Pertumbuhan *Bacillus* sp. SKII-5

Pada fase eksponensial, bakteri menghidrolisis sumber karbon utama yaitu lemak intestinum dan rumen dengan menghasilkan ekstraselular enzim berupa lipase untuk memenuhi kebutuhan nutrisi selama proses kultivasi (Anderson & Jayaraman *et al.*, 2003, Gupta *et al.*, 2004). Pertumbuhan bakteri sebanding dengan laju kematian bakteri terjadi pada fase stasioner. Hal ini terjadi akibat berkurangnya nutrisi dalam medium pertumbuhan bakteri serta akumulasi produk samping metabolisme (Madigan *et al.*, 2012; Pommerville, 2014). Berdasarkan gambar 4.5, jumlah sel fase eksponensial *Bacillus* sp. SKII-5 pada medium lemak rumen lebih tinggi dibandingkan dengan medium lemak intestinum (Lampiran 9), hal ini berkaitan dengan kadar karbon (C) lemak rumen yang lebih tinggi dibandingkan dengan lemak intestinum. Kadar karbon yang tinggi sebanding dengan pertambahan jumlah sel, karena karbon merupakan komponen terbesar dalam pembentukan sel (Moat *et al.*, 2002).

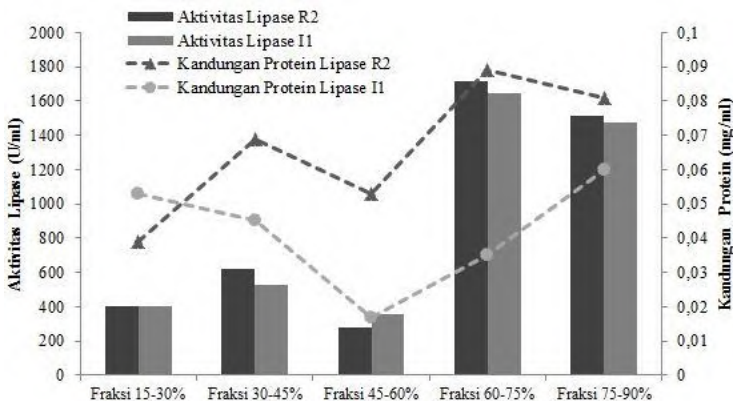
4.3 Purifikasi Lipase

Pemurnian enzim dilakukan dengan presipitasi menggunakan garam Ammonium Sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Doung-Ly & Gabelli, 2014). Garam ammonium sulfat akan menarik molekul air dari protein, sehingga protein yang memiliki polaritas sama akan mengendap. Aktivitas lipase tertinggi pada kedua jenis

lipase dicapai pada fraksi pemurnian 60-75% (Gambar 4.6 dan Lampiran 10). Menurut Odunuga *et al.* (2013), setiap protein akan mengendap pada konsentrasi garam yang berbeda. Fraksi presipitasi pada 60-75% dengan aktivitas yang tinggi ini juga diperoleh oleh Sharma *et al.* (2002), Rakesh Kumar *et al.* (2012) dan Suprihana (2013).

Prinsip pengendapan dengan garam, ion garam akan mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi rendah, ion-ion garam melingkupi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul protein. Sedangkan pada konsentrasi garam tinggi, muatan listrik disekitar protein meningkat sehingga menarik molekul air dari koloid protein dan menyebabkan interaksi hidrofobik diantara sesama molekul protein yang disebut *salting-out* (Putri *et al.*, 2013).

Berdasarkan Gambar 4.6 aktivitas kedua lipase hasil purifikasi fraksi 60-75% dengan menggunakan dua substrat lemak 0,11% intestinum dan 0,21% rumen berturut-turut adalah sebesar 1642,6 U/ml dan 1717,3 U/ml dengan kandungan protein 0,035 mg/ml dan 0,089 mg/ml.



Gambar 4.6 Aktivitas Lipase dan Kandungan Protein dalam Proses Purifikasi

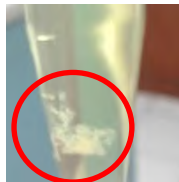
Keterangan :

- Lipase R2 adalah lipase yang dihasilkan dengan menggunakan 0,21% lemak rumen sebagai substrat.
- Lipase I1 adalah lipase yang dihasilkan dengan menggunakan 0,11% lemak intestinum sebagai substrat.

Enzim hasil *salting-out* pada setiap fraksi telah bebas dari kontaminan non-protein, akan tetapi masih mengandung protein non-enzim (Putri *et al.*, 2013). Berdasarkan Gambar 4.6, kandungan protein Lipase I1 fraksi ammonium sulfat 15-30%, 30-45% dan 75-90% memiliki kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi 60-75%. Hal ini dimungkinkan karena adanya protein non enzim yang terkestrak oleh ammonium sulfat (Putri *et al.*, 2013).

4.4 Karakterisasi Lipase

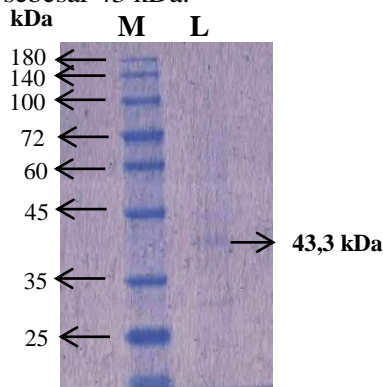
Titik isoelektrik merupakan kondisi molekul protein mempunyai muatan positif dan negatif yang sama sehingga saling menetralkan atau bermuatan nol (Kirkwood *et al.*, 2015). Titik isoelektrik lipase yang dipurifikasi tercapai pada pH 5 yang mencirikan karakteristik protein lipase terkoagulasi (Gambar 4.7), Titik isoelektrik lipase yang dihasilkan oleh genus *Bacillus* memiliki beberapa pH yang bervariasi. Titik isoelektrik Lipase dari *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus* sp. A30-1, *Bacillus stearothermophilus*, dan *Bacillus* sp. H-257 berturut-turut adalah 6, 5.15, and 4.66 (Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Shen *et al.* 1992; Imamura & Kitoura (2000)).



Gambar 4.7 Koagulasi yang Menunjukkan Titik Isoelektrik

Karakter lain yang perlu diketahui adalah berat molekul lipase. Berat molekul enzim lipase ditentukan dengan metode SDS-PAGE. Prinsip analisis SDS-PAGE yaitu pemisahan protein. Protein yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan protein berukuran besar. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar (Marker). Berat molekul lipase berada diantara 19-75 kDa (Padilha *et al.*, 2012).

Pita hasil elektroforesis yang muncul dihitung nilai Rf-nya kemudian dibandingkan dengan pita-pita dari protein marker yang sudah diketahui berat molekulnya (Suprihana, 2013), nilai Rf pita yang muncul dimasukkan pada kurva standar marker (Lampiran 11). Berdasarkan Gambar 4.8 berat molekul lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. SKII-5 adalah 43,3 kDa. Hal ini diperkuat dengan penelitian oleh Shariff *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. memiliki berat molekul 43 kDa. Selain itu, Schmidt-Dannert *et al.* (1996) juga menyebutkan bahwa lipase yang dihasilkan *Bacillus thermocatenulatus* sebesar 43 kDa.



Gambar 4.8 Hasil SDS PAGE Lipase. M adalah marker dan L adalah lipase.

Nthangenia *et al.* (2001) mengklasifikasikan lipase yang dihasilkan oleh genus *Bacillus* menjadi dua subfamili berdasarkan analisis asam amino dan karakter biokimia. Lipase dengan berat molekul 19-20 kDa masuk kedalam subfamili I.4. Sedangkan lipase dengan berat molekul sekitar 43 kDa masuk kedalam subfamili I.5. Gen LipA *Bacillus* mengkode lipase subfamili I.5 dengan karakteristik panjang asam amino 388. Lipase dengan berat molekul sekitar 43 kDa dihasilkan dari inkubasi suhu 50°C, sehingga bersifat *thermostable* (stabil terhadap suhu) (Shah & Batt, 2011; Shariff *et al.*, 2011).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian adalah limbah rumah potong hewan berupa lemak intestinum dan rumen dapat dimanfaatkan sebagai substrat dalam produksi lipase oleh *Bacillus* sp. SK II-5 dengan aktivitas *crude* enzim terbesar adalah 3009,3 U/ml dan 2858,6 U/ml.

5.2 Saran

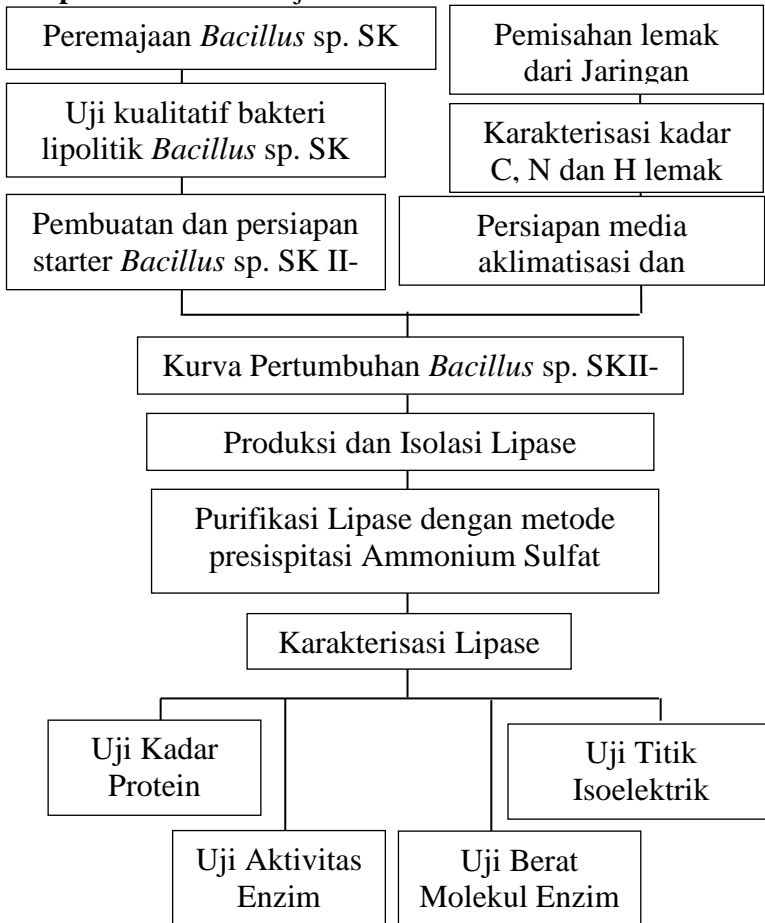
Saran penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut.

1. Proses pemisahan lemak sebaiknya menggunakan pelarut non-polar seperti klorform, agar hasil ekstraksi lebih optimal.
2. Pengukuran aktivitas enzim dengan menggunakan substrat p-nitrophenyl palmitate dapat disubstitusi menggunakan minyak zaitun, karena minyak zaitun lebih mudah untuk didapatkan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian



LAMPIRAN 2. Medium Fermentasi**Basal Medium (dalam 1 Liter)**

- | | | |
|--|-------|--------|
| a. Peptone | 0,05% | 0,5 gr |
| b. KH_2PO_4 | 0,1% | 1 gr |
| c. K_2HPO_4 | 0,3% | 3 gr |
| d. Na_2SO_4 | 0,2% | 2 gr |
| e. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,01% | 0,1 gr |
| f. gum arab | 0,1% | 1 gr |
| g. tween80 | 0,1% | 1 mL |

Konsentrasi Lemak Intestinum dan Rumen (gr/100mL)

- | | |
|----------------------|---------|
| a. Konsentrasi 0,11% | 0,11 gr |
| b. Konsentrasi 0,21% | 0,21 gr |
| c. Konsentrasi 0,31% | 0,31 gr |
| d. Konsentrasi 0,42% | 0,41 gr |

Lampiran 3. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl pH 8,0 konsentrasi 50 mM.

Pembuatan buffer Tris-HCl (Mr 157,6) pH 8 50mM adalah dengan menyiapkan bahan Tris-HCl dan NaOH.

1. Pembuatan stock Tris-HCl pH 8 0,5M

$$M = \frac{\text{Berat Tris-HCl}}{\text{Mr Tris-HCl}} \times \frac{1000}{\text{Volume}}$$

$$0,5 = \frac{\text{Berat Tris-HCl}}{157,6} \times \frac{1000}{50 \text{ ml}}$$

$$\text{Berat Tris-HCl} = 3,94 \text{ gr}$$

Sebanyak 3,94 gr Tris-HCl dilarutkan dalam 20 ml aquades, kemudian ditambahkan NaOH sebanyak 2 ml, sehingga pH larutan mencapai 8. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga volume mencapai 50 ml.

2. Pengenceran buffer menjadi 50 mM

Stock Tris-HCl pH 8 0,5 M diambil sebanyak 1 ml, kemudian diencerkan dengan menggunakan aquades sebanyak 9 ml. Volume total buffer Tris-HCl 50 mM adalah 10 ml

Lampiran 4. Kurva Standart 4-Nitrophenol

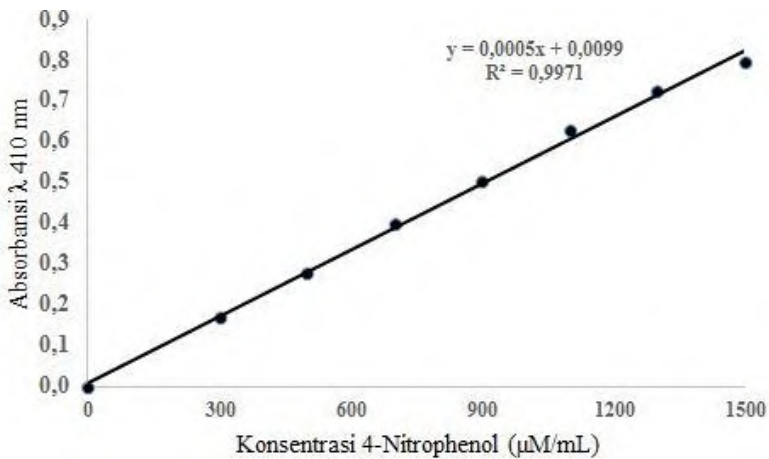
Pembuatan kurva standar 4-Nitrophenol (pNP) dilakukan dengan menyiapkan stok 4-Nitrophenol (1 mM) dengan perhitungan konsentrasi sebagai berikut:

$$M = \frac{\text{Berat pNP}}{\text{Mr pNP}} \times \frac{1000}{\text{Volume}}$$

$$(10 \times 10^{-2}) \text{ mM} = \frac{\text{Berat pNP}}{139,1} \times \frac{1000}{10 \text{ ml}}$$

$$\text{Berat pNP} = 13,917 \text{ mg}$$

| Konsentrasi 4-Nitrophenol ($\mu\text{M/mL}$) | Absorbansi (λ 410 nm) |
|---|-----------------------------------|
| 300 | 0,17067 |
| 500 | 0,27800 |
| 700 | 0,40133 |
| 900 | 0,50333 |
| 1100 | 0,62800 |
| 1300 | 0,72467 |
| 1500 | 0,79667 |

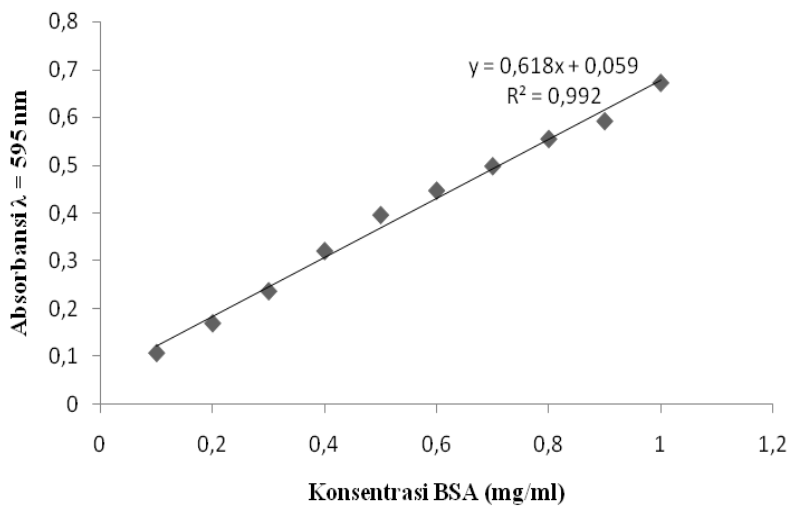


LAMPIRAN 5. Pembuatan Kurva Standart BSA

Pembuatan Kurva Standar BSA dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1. Reagen Bradford dibuat dengan melarutkan 100 mg *coomasie brilliant blue* (CBB) G-250 kedalam 50 mL etanol 95 % dan ditambahkan 100 mL asam fosfor 85 %. Larutan dilarutkan dengan akuades hingga volume akhir mencapai 1 L.
2. Larutan standar protein dibuat dengan menimbang Bovine Serum Albumin (BSA) dan dilarutkan dalam H₂O sehingga diperoleh larutan standar BSA dengan berbagai konsentrasi (w/v).
3. Larutan BSA sebanyak 0.1 mL yang akan diuji ditambahkan 5 mL reagen Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.
4. Hasil absorpsi tersebut dibuat regresi linear dan didapatkan persamaan $y = ax + b$, dimana y adalah nilai absorbansi dan x adalah nilai konsentrasi protein standar BSA. Standar protein yang diperoleh dari nilai absorbansi standar yang akan didapatkan kadar protein terlarut dari larutan ekstrak substrat.

| Konsentrasi BSA (mg/ml) | Absorbansi ($\lambda = 595 \text{ nm}$) |
|----------------------------|--|
| 0,1 | 0,108 |
| 0,2 | 0,17 |
| 0,3 | 0,237 |
| 0,4 | 0,321 |
| 0,5 | 0,396 |
| 0,6 | 0,447 |
| 0,7 | 0,498 |
| 0,8 | 0,555 |
| 0,9 | 0,592 |



LAMPIRAN 6. Perhitungan Aktivitas Enzim dan Kandungan Protein Lipase

1. Aktivitas Lipase (*Crude* Enzim yang dihasilkan dengan menggunakan substrat rumen 0,21%)

Persamaan kurva standar pNP, $y = 0,0005x - 0,0099$

Absorbansi ($\lambda = 410$ nm) sebesar 2,257

Aktivitas Lipase (Unit ml^{-1})

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\mu\text{mol pNP}}{t} \times \text{faktor pengenceran} \\
 &= \frac{4514}{15} \times 10 \\
 &= 3009,3 \text{ Unit } \text{ml}^{-1}
 \end{aligned}$$

Keterangan dan penjelasan

- Pada persamaan kurva standar, y merupakan nilai absorbansi dan x merupakan konsentrasi pNP
- 60 Pada perhitungan konsentrasi glukosamin (x), nilai 0,0099 diabaikan karena jika absorbansi besar, pertambahan konsentrasi juga semakin besar

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor pengenceran} &= \frac{\text{total volume}}{\text{Volume enzim}} \\
 &= \frac{2 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}} \\
 &= 10
 \end{aligned}$$

- Satuan aktivitas enzim adalah $\text{Unit}/\text{ml} = \mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$

2. Kandungan Protein (*Crude* Enzim yang dihasilkan dengan menggunakan substrat rumen 0,21%)

Persamaan kurva standar BSA, $y = 0,618x + 0,059$

Absorbansi (λ 595 nm) sebesar 0,140

Kandungan Protein Lipase (mg/ml)

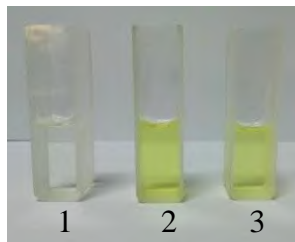
$$\begin{aligned}
 &= \text{nilai absorbansi} : 0,618 \\
 &= 0,140 : 0,618 \\
 &= 0,226 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

LAMPIRAN 7. Karakteristik Lemak Hasil Pemisahan dari Jaringan.

| Parameter | Intestinum | Rumen |
|--------------|------------|-------|
| Karbon (%) | 71,82 | 74,58 |
| Nitrogen (%) | 2,11 | 1,86 |
| Hidrogen (%) | 13,82 | 11,55 |
| Lemak (Gram) | 347,78 | 53,27 |

LAMPIRAN 8. Aktivitas dan Kandungan Protein Enzim Kasar (*Crude*) Lipase

| Persentase Substrat Untuk Produksi | Intestinum | | Rumen | |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Aktivitas Lipase (U/mL) | Kandungan Protein (mg/mL) | Aktivitas Lipase (U/mL) | Kandungan Protein (U/mg) |
| 0,11% | 2858,6 | 0,102 | 312 | 0,367 |
| 0,21% | 2153,3 | 0,155 | 3009,3 | 0,220 |
| 0,31% | 2256 | 0,139 | 1126,6 | 0,236 |
| 0,42% | 2586,6 | 0,104 | 384 | 0,231 |



(B)



(B)

Keterangan Gambar :

(A) Pengujian aktivitas *crude* lipase. Apabila terjadi pemecahan p-Nitrophenol palmitate (pNPP) menjadi p-Nitrophenol (pNP) dan palmitate oleh lipase, substrat akan mengalami perubahan warna dari bening menjadi kuning. Warna kuning merupakan pNP.

| No | Komposisi | Status |
|----|----------------------|--------------------------|
| 1 | Substrat + Aquades | Tidak terjadi hidrolisis |
| 2 | Substrat + Lipase R2 | Terjadi hidrolisis |
| 3 | Substrat + Lipase I1 | Terjadi Hidrolisis |

(B) Pengujian kandungan protein *crude* lipase. Protein ketika bereaksi dengan reagen Bradford akan berwarna biru.

LAMPIRAN 9. Nilai Absorbansi Kurva Pertumbuhan *Bacillus* sp. SKII-5 menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 600 nm.

| Jam Ke- | Substrat Intestinum 0,11% | Substrat Rumen 0,21% |
|---------|---------------------------|----------------------|
| 0 | 0,000 | 0,000 |
| 2 | 0,025 | 0,026 |
| 4 | 0,015 | 0,028 |
| 6 | 0,058 | 0,049 |
| 8 | 0,120 | 0,092 |
| 10 | 0,162 | 0,117 |
| 12 | 0,216 | 0,285 |
| 14 | 0,237 | 0,448 |
| 16 | 0,288 | 0,662 |
| 18 | 0,423 | 0,604 |
| 20 | 0,559 | 0,669 |
| 22 | 0,554 | 0,699 |
| 24 | 0,637 | 0,775 |
| 26 | 0,669 | 0,790 |
| 28 | 0,736 | 0,806 |
| 30 | 0,759 | 0,809 |
| 32 | 0,736 | 0,740 |
| 34 | 0,730 | 0,745 |
| 36 | 0,727 | 0,757 |
| 38 | 0,737 | 0,760 |
| 40 | 0,724 | 0,806 |

LAMPIRAN 10. Aktivitas dan Kandungan Protein Lipase Hasil Purifikasi Ammonium Sulfat.

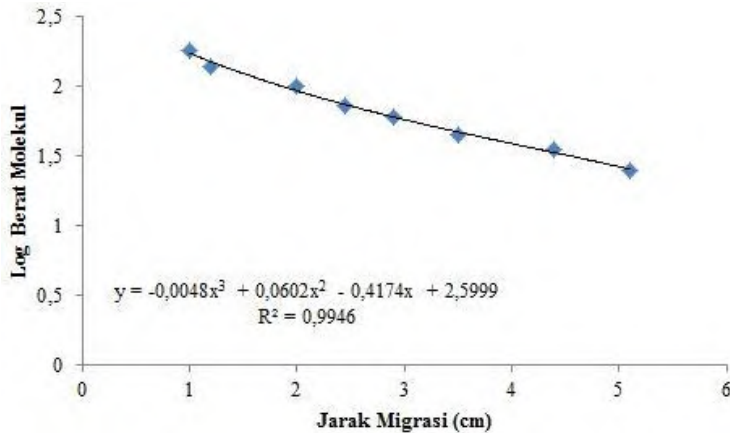
| Fraksinasi | Lipase Intestinum | | Lipase Rumen | |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | Aktivitas Lipase (U/mL) | Kandungan Protein (mg/mL) | Aktivitas Lipase (U/mL) | Kandungan Protein (mg/mL) |
| Fraksi I (15-30%) | 400 | 0,074 | 400 | 0,039 |
| Fraksi II (30-45%) | 530,6 | 0,045 | 617,3 | 0,069 |
| Fraksi III (45-60%) | 358,6 | 0,017 | 277,3 | 0,053 |
| Fraksi IV (60-75%) | 1642,6 | 0,035 | 1717,3 | 0,089 |
| Fraksi V (75-90%) | 1477,3 | 0,060 | 1512 | 0,081 |

Lampiran 11. Kurva Standar Marker

1. Perhitungan jarak migrasi pita marker hasil SDS-PAGE

| Jarak migrasi (Rf) (cm) | Berat Molekul | Log Berat Molekul |
|----------------------------|---------------|-------------------|
| 1 | 180 | 2,255272505 |
| 1,2 | 140 | 2,146128036 |
| 2 | 100 | 2 |
| 2,45 | 72 | 1,857332496 |
| 2,9 | 60 | 1,77815125 |
| 3,5 | 45 | 1,653212514 |
| 4,4 | 35 | 1,544068044 |
| 5,1 | 25 | 1,397940009 |

2. Pembuatan kurva standar



Jarak migrasi pita lipase = 3,7 cm

$$y = -0,0048x^3 + 0,0602x^2 - 0,4174x + 2,5999$$

$$y = -0,0048(3,7)^3 + 0,0602(3,7)^2 - 0,4174(3,7) + 2,5999$$

$$y = 1,6365236$$

Berat molekul lipase

$$10^{1,6365236} = 43,3 \text{ kDa}$$

Lampiran 12. Dokumentasi Peremajaan *Bacillus* sp. SKII-5






Streak 16



Streak kontinyu

Lampiran 13. Organ *Visceral* dan Lemak

| | |
|-----------------------|--|
| Organ Rumen |  |
| Organ Intestinum |  |
| Lemak Hasil Pemisahan |  |

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian adalah limbah rumah potong hewan berupa lemak intestinum dan rumen dapat dimanfaatkan sebagai substrat dalam produksi lipase oleh *Bacillus* sp. SK II-5 dengan aktivitas *crude* enzim terbesar adalah 3009,3 U/ml dan 2858,6 U/ml.

5.2 Saran

Saran penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut.

1. Proses pemisahan lemak sebaiknya menggunakan pelarut non-polar seperti klorform, agar hasil ekstraksi lebih optimal.
2. Pegukuran aktivitas enzim dengan menggunakan substrat p-nitrophenyl palmitate dapat disubstitusi menggunakan minyak zaitun, karena minyak zaitun lebih mudah untuk didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

Akter, S. Hasina. 2011. **Histomorphological and immunohistochemical characterization of different fat depots of dairy cows during early lactation.** Institut für Tierwissenschaften, Abteilung Physiologie und Hygiene. Germany.

Anderson R. K. I. and Jayaraman K. 2003. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for Biopesticide Production. **Chem. Biochem. Eng. Q.** **17** (3) 225–231.

Anugwa, F. O. I., Varel, V. H., Dickson, J. S., Pond, W. G. Krook, L.P. 1989. Effects Of Dietary Fiber And Protein Concentration On Growth, Feed Efficiency, Visceral Organ Weights And Large Intestine Microbial Populations Of Swine. **The Journal Of Nutrition.** 119:879-886.

AOAC. 1990. **Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist.** USA: AOAC, Inc.

Atmaja, Qintan I. 2015. **Produksi Kitin Deasetilase oleh Bacillus sp. SK II-5.** Biologi ITS. Surabaya.

Bardford, Marion M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry.** Vol 72, 248-254

Bauchart, D. 1992. Lipid Absorption and Transport in Ruminants. **Journal of Dairy Science.** Vol. 76, No. 12. Pp. 3864-3881.

Bayoumi, R. A. Atta, H. M. and El-Sehrawy, M. H. 2012. Bioremediation of Khormah Slaughter House Wastes by

Production of Thermoalkalstable Lipase for Application in Leather Industries. **Life Science Journal**. 9(4). Pp1324-1335.

Bio-Rad Protocol. 2014. **A Guide To Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection**. USA.

Blackburn, H., and Hobson, N. 1960. Isolation of Proteolytic Bacteria from the Sheep Rumen. **J. gen. Microbiol.** 22,282-289.

Bonala K. Chakravarthy And Mangamoori L. Narasu. 2012. Production And Optimization Of Lipase From *Bacillus Tequilensis* Nrrl B-41771. **International Journal Of Biotechnology Applications**. Volume 4, Issue 1, Pp.-134-136.

Bora, Limpon dan Bora Minakshi. 2012. Optimization Of Extracellular Thermophilic Highly Alkaline Lipase From Thermophilic *Bacillus* sp Isolated from Hotspring Of Arunachal Pradesh, India. **Brazilian Journal of Microbiology**. pp 30-42.

Bornscheuer, Uwe T., C. Bessler, Ramisetty S. and S. H. Krishna. 2002. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **TRENDS in Biotechnology** Vol.20 No.10. pp433-437.

Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248-254.

Breed, R.S, Murray, E.G.D. and Smith.N.R. 1957. **Bergey's Manual Determinative Bacteriology Seventh Edition**. The Williams and Wilkins Company. USA.

Burgess, Thomson, Anthony C. Grabski1 and Richard R.. 2002. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide

gel electrophoresis: procedures and tips¹". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 62: 191-201.

Bvahan, Manak. 2004. Solid Mineral Fuels : Determination Of Carbon And Hydrogen Liebig Method. **Solid Mineral Fuels Sectional Committee. Indian Standart**. New Delhi.

Cai, Xianghai., Jing Mq, Dong-zhi Wei, Jin-ping Lin, Wei Wei. 2014. Functional expression of a novel alkaline-adapted lipase of *Bacillus amyloliquefaciens* from stinky tofu brine and development of immobilized enzyme for biodiesel production. **Antonie van Leeuwenhoek**. 106:1049–1060.

Castro-Ochoa, Lelie D., Citlali, Rodriguez-Gomez, Gerardo Valerio-Alfaro, Rosamaria Oliart Ros. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**. 37 : pp 648–654.

Cirne, D.G. X. Paloumeta, L. Björnsson,, M.M. Alves, B. Mattiasson.2007. Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. **Journal of Renewable Energy**. Vol 32. pp 965–975.

Christie, William, W. 1981. **Lipid Metabolism in Ruminant Animal**. Pergamon Press. England.

Dashty, Monireh. 2014. A Quick Look at Biochemistry: Lipid Metabolism. **J. Diabetes Metab**. Volume 5 Issue 1 2: 32

de Almeida, A. F., Sâmia M. Tauk-Tornisielo and Eleonora C. C. 2013. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential Application. **BioMed Research International**. pp1-10.

Dodson M. V., Hausman, G. J. Guan L. L., Du, M., Rasmussen, T. P., Poulos S. P., Mir, P., Bergen W. G., Fernyhough M. E., McFarland, D. C., Rhoads R. P., Soret, B., Reecy J. M., Velleman, S. G., and Jiang, Z. 2010. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. **International Journal of Biological Sciences**. 6(7):691-699.

Duong-Ly, Krisna C. And Sandra B. Gabelli. 2014. **Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. Methods in Enzymology**, Volume 541. Elvisier Inc. Pp 85-94.

Drackley, J.K. 2000. Lipid Metabolism. **CAB International Farm Animal Metabolism and Nutrition**. Pp 97-119.

Draper, Harold. H. 1982. **Advances in Nutritional Research Volume 4**. Plenum Press. New York and London.

Ertuğrul, S., Dönmez, G. and S. Takac. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**. 149 : 720–724.

Fitzsimons, C., D. A. Kenny and M. McGee. 2014. Visceral organ weights, digestion and carcass characteristics of beef bulls differing in residual feed intake offered a high concentrate diet. **Journal of The Animal Consortium**. 8: 6, pp 949-959.

Georgiou, Christos D., Konstantinos, Grintzalis., George Zervoudakis, Ioannis Papapostolou. 2008. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. **Anal Bioanal Chem**. 391:391–403.

Gunasekaran, V. and Das, D. 2005. Lipase Fermentation : Progress and Prospects. **Indian Journal Of Biotechnology**. Vol. 4. Pp 437-445.

Gupta, R., N. Gupta. And P. Rathi. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Journal of Appl Microbiol Biotechnol**. 64: 763–781.

Guyton, Arthur C. M.D. John E. Hall. 2006. **Textbook Of Medical Physiology**. Elsevier Inc. China.

Houde, A., Kademi, A. And Leblanc D. 2004. Lipases and Their Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology Journal**. Vol. 118. Pp 155-170.

Hofmann, R. R and P. Scholz. 1968. Applied Topographic-Anatomical Studies Of East African Game Ruminants. E. **Afr. Wildl. J.** 6: 107-123.

Imamura, Shigeyuki and Kitaura, Shiro. 2000. Purification and Characterization of a Monoacylglycerol Lipase from the Moderately Thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J. Biochem.** 127,419-425.

Jaeger, K-E., B.W. Dijkstra And M. T. Reetz. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, And Biotechnological Applications Of Lipases. **Annu. Rev. Microbiol.** Vol 53:315–351.

Jaegert. K.E and Eggert, T. 2002. **Lipase for Biotechnology**. Book Chapter. pp390-397.

Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., Bawa, A. S. 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat,

poultry and fish processing industries: a review. **J Food Sci Technol.** 49(3):278–293.

Joseph, B., Ramteke, P. W., Thomas, G., and Nitisha S. 2007. Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Review** Vol. 2 (2), pp. 039-048.

Kamijo, T., A. Saito, S., Ema, Inchi Yoh, Hiroko H. R. Nagata, Y. Nagata and A. Ando. 2011. Molecular and enzymatic characterization of a subfamily I.4 lipase from an edible oil-degrader *Bacillus* sp. HH-01. **Journal of Antonie van Leeuwenhoek** 99:179–187.

Kim, Byung H. and Gadd, Geoffrey M. 2008. **Bacterial Physiology and Metabolism.** Cambridge University Press. UK.

Kim, Hyung K., Hwa Jung Choi, Myung H. K., C. B. Sohn, Tae Kwang Oh. 2002. Expression and characterization of Ca^{2+} -independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1583 pp. 205-212.

Kirkwood, Jobie., David Hargreaves, Simon O’Keefe and Julie Wilson. 2015. Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials. **Bioinformatics.** 31(9), pp 1444–1451

Kozloski, G. V., da Rocha, J. B. T., Ciocca, M.de L.S. 2001. Visceral Metabolism and Efficiency of Energy Use by Ruminants. **Journal of Ciência Rural**, v. 31, n.5. Pp 909-915.

Kumar, Davender., Lalit, Kumar., Nagar, S., Chand, R, R. Parshad,Vijay, Kumar G. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2

and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Scholars Research Library**. Vol 4 (4): pp 1763-1770.

López-López, Olalla, María-Esperanza Cerdán and María-Isabel González-Siso. 2015. *Thermus thermophilus* as a Source of Thermostable Lipolytic Enzymes. **Journal of Microorganisms**. Vol. 3, 792-808.

Madigan, Michael T., Martinko, John M., David A. Stahl, and David P. Clark. 2012. **Brock Biology of Microorganisms Thirteenth Edition**. Benjamin Cummings Publishing. San Francisco.

Moat, Albert G., John W. Foster, and Michael P. Spector. 2002. **Microbial physiology 4th Edition**. A John Wiley & Sons, Inc. USA.

Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., Nosrati, M. and Amani, T. 2012. Enzymatic Pre-Hydrolysis of high fat Content Dairy Wastewater as a Pretreatment for Anaerobic Digestion. **Int. J. Environ. Res.**, 6(2):475-480.

Mohan, T. Selva, A. Palavesam and G. Immanuel. 2008. Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste. **African Journal of Biotechnology** Vol. 7 (15), pp. 2728-2735.

Moran, John. 2005. Tropical Dairy Farming : Feeding Management for Small Holder Dairy Farmers in The Humid Tropics (How The Rumen Works). **Book Chapter**. 312 pp. Landlinks Press.

Muthazhagan, K. and Thangaraj, M. 2014. Production And Partial Characterization Of Lipase By *Bacillus sp* Isolated From Vellar

Estuary Sediment. **International Journal of Science Inventions Today**. 3(6), 639-653.

Nevin, Peter., David Koelsch and Charles M. Mansbach Z. 1995. Intestinal triacylglycerol storage pool size changes under differing physiological conditions. **Journal of Lipid Research**. Volume 36. pp 2405-2412.

Nthangenia, Mulalo B. Hugh-George P., Andre van T., Wilma P. V., D. Litthauer. 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. vol 28 pp705–712.

Odunuga Odutayo O. and Alina Shazhko. 2013. Ammonium sulfate precipitation combined with liquid chromatography is sufficient for purification of bovine serum albumin that is suitable for most routine laboratory applications. **Biochemical Compounds**. pp.1-6.

Okafor, Nduka. 2007. **Modern Industrian Microbiology and Biotechnology**. Science Publisher. USA.

Økstad, Ole Andreas and Anne-Brit Kolstø. 2011. **Genomics of *Bacillus* Species**. Book Chapter. Springer Science.

Padilha, Giovana da Silva., José Carlos Curvelo Santana, Ranulfo Monte Alegre and Elias Basile Tambourgi. 2011. Extraction of Lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and Its Biochemical Characterization. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**. Vol.55, n. 1: pp. 7-19.

Padmapriya, B., T. Rajeswari, E.Noushida,Dhannya G. S. and Chidambaram K.V. 2011. Production of Lipase Enzyme from

Lactobacillus spp. and Its Application in the Degradation of Meat. **World Applied Sciences Journal**. 12 (10): 1798-1802.

Padmono, Djoko. 2005. Alternatif Pengolahan Limbah Rumah Potong Hewan-Cakung (Suatu Studi Kasus). **Jurnal Teknik Lingkungan**. P3TL.BPPT.6. (1):303-310.

Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., P. Diamantopoulou, A. Philippoussis, M. Galiotou-Panayotou and G. Aggelis. 2011. Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. **Journal of Applied Microbiology**. 110, 1138–1150.

Peraturan Menteri Pertanian RI No. 13 Tahun 2010. Tentang: **Persyaratan Rumah Potong Hewan Ruminansia Dan Unit Penanganan Daging (Meat Cutting Plant)**.

Pitchel, John. 2005. **Waste Management Practices Municipal, Hazardous and Industrial**. Taylor and Francise Group. USA.

Pommerville, Jeffrey C. 2014. **Fundamental of Microbiology**. Junes and Bartlett Learning. USA.

Prasad, M.P and Manjunath K. 2011. Comparative Study on Biodegradation of Lipid-Rich Wastewater Using Lipase Producing Bacterial Species. **Indian Journal of Biotechnology**. Vol 10. Pp 121-124.

Prescott, Harley. 2002. **Laboratory Excercise in Micobiology: Fifth Edition**. The McGraw-Hill. USA.

Putranto, Wendry Setiyadi., Sri Budiarti, Magy T Suhartono, I Wayan T. Wibawan, Zainatul Hayati. 2006. Pemurnian Ekstraseluler Hyaluronidase *Streptococcus agalactiae*

(Streptokokus Grup B). **Jurnal Ilmu Ternak**. VOL. 6 NO. 1, 16–22.

Putri, Ranika A., Ali K., Asep S. 2013. Kajian Penggunaan Amonium Sulfat pada Pengendapan Enzim Protease (Papain) dari Buah Pepaya sebagai Koagulan dalam produksi Keju *Cottage*. **Jurnal Sains dan Teknologi Kimia**. Vol 4 No. 2 hal 159-168.

Rahmawati, Tri. 2013. **Reduksi Emisi Amonia Menggunakan Biofilter Pada Proses Pengomposan Limbah Padat Rumah Potong Hewan Dengan Sistem *Five-Stage Sequencing Batch Reactor***. Teknik Lingkungan ITS. Surabaya.

Rajendran, Aravindan and Thangavelu, Viruthagiri. 2012. Optimization and Modeling of Process Parameters for Lipase Production by *Bacillus brevis*. **Food Bioprocess Technol** 5:310–322.

Rakesh Kumar, Sharma A., Kumar, A., and Singh D. 2012. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Properties. **World Applied Sciences Journal** 16 (7): 940-948.

Ramani, K. Chockalingam, E., and G. Sekaran. 2010. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 37:531–535.

Ratnawati, R and Trihadiningrum Y. 2014. Slaughter House Solid Waste in Indonesia. **Journal of Biological Researches**. Vol. 19 pp69-73.

Schaechter, Moselio. 2006. From growth physiology to systems biology. **International Microbiology**. 9:157-161

Salminen, E. and J. Rintala. 2002. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. **Journal of Bioresource Technology**. vol. 83 pp13–26.

Saxena, R.K. Anita S., B. Giri, and W. S. Davidson. 2003. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**. vol. 52 : 1 – 18.

Selvamohan, T. V. Ramadas and T. A. Sathya. 2012. Optimization of Lipase Enzyme Activity Produced By *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated From Rock Lobster *Penlirus homarus*. **International Journal of Modern Engineering Research**. Vol.2, Issue.6, pp-4231-4234.

Setyati, Wilis Ari dan Subagiyo. 2012. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. **Jurnal Ilmu Kelautan**. Vol. 17 (3) hal. 164-168.

Shariff, F. Mohd, R. N. Zaliha, R Abd. Rahman, M. Basri and Abu B. Salleh. 2011. A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. **International Journal of Molecular Sciences**. Vol. 12, 2917-2934.

Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Journal of Biotechnology Advances**. Vol. 19. Pp 627-662.

Sharma, Disha. B.K.Kumbhar, A.K.Verma, LakshmiTewari. 2014. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus* sp. **Journal of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Vol 3 pp205–211

Sharma, R. S.K. Soni, R.M. Vohra, L.K. Gupta, J.K. Gupta. 2002. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry** **37** pp1075–1084.

Sigma-Aldrich Protocol. 2013. **Product Information Alkaline Buffer Solution 1.5 M, pH 10.3 (25 °C)**. Spruce street, St. Louis. USA.

Suprihana, Moh. Sui. 2013. Fraksinasi Enzim Lipase Dari Endosperm Kelapa Dengan Metode Salting Out. **AGRITECH**, Vol. 33, No. 4. Pp 377-383.

Shah K. R., Bhatt S. A. 2011. Purification and characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Pa2. **J Biochem Tech.** 3(3): 292-295.

Shen, Gwo-Jen. Kailash C. Srivastava, Yongxiang Wang, Henry Y. Wang. 1992. Essentially Purified, Thermostable and Alkalophilic Lipase from *Bacillus* sp. A30-1 ATCC 53841. **United States Patent**.

Schmidt-Dannert, C., M. Luisa R., H.Atomi, Rolf D. Schmid. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1301. pp105-114.

Tisch, David A. 2006. **Animal Feeds, Feeding and Nutrition and Ration Evaluation**. Delmar Publisher. USA.

Toldrà, Fidel. Y. H. Hui, Iciar Astiasarán, Wai-Kit Nip, Joseph G. Sebranek, Expedito-Tadeu F. Silveira, Louise H. Stahnke, Régine Talon. 2015. **Handbook of Fermented Meat and Poultry**. Blackwell Publishig. USA.

Treichel, H., D. de Oliveira, M. A. Mazutti, M. Di Luccio, J. V. Oliveira. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technol.** 3:182–196.

Ülker, S., Arzu O., Ahmet C., Şengul A. K. 2011. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turk J. Biol.** 35 : 543-550.

Vakhlu, Jyoti and Avneet Kour. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology** ISSN: 0717-3458. Vol.9 No.1.pp69-85.

van Pouderoyen, Gertie, T. Eggert, K-E Jaeger and Bauke W. D. 2001. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal α/β Hydrolase Fold Enzyme. **J. Mol. Biol.** vol. 309, 215-226.

Biodata Penulis



Penulis bernama Kholilah Nur Hidayah, lahir di Jombang, tanggal 22 Juli 1994 dari ayah bernama Achmad Multazam dan ibu Anik Khamidah. Penulis lulus dari SMAN 2 Jombang tahun 2012 dan tercatat sebagai mahasiswa jurusan Biologi ITS angkatan 2012 melalui tes SNMPTN Tulis. Sejak SMA, penulis aktif mengikuti kompetisi karya tulis ilmiah, dan menjuarai 2 kategori tingkat nasional. Tidak berhenti disitu, penulis tetap mengikuti kompetisi karya tulis ilmiah selama menjadi mahasiswa biologi ITS. Penulis telah menjuarai kompetisi ilmiah tingkat nasional dan pernah menjadi finalis LKTI Unsri dan Undip. Pencapaian tertinggi adalah ketika penulis menjuarai lomba dengan mendapatkan *silver medal* dan *leading innovation award* dalam *International Engineering Invention Innovation and Exhibition* pada tahun 2016 di Perlis, Malaysia. Penulis telah mempublikasikan salah satu penelitian di *2nd International Biology Conference 2014*. Penulis aktif dalam organisasi kemahasiswaan dengan menjadi Ketua Departemen Riset dan Teknologi Himpunan Mahasiswa Biologi ITS 2014/2015. Selain itu, penulis juga aktif sebagai *trainer* keilmiah di bawah naungan Badan Eksekutif Mahasiswa pada Departemen Riset dan Tekonologi BEM ITS 2015 serta menjadi pembicara dalam bidang keilmiah riset dan teknologi. Penulis pernah menjadi asisten Struktur Perkembangan Tumbuhan, Genetika, Mikrobiologi serta Wawasan Teknologi dan Komunikasi Ilmiah. Pada tahun 2015, penulis melaksanakan kerja praktek selama satu bulan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Bogor dan mengambil bidang Bioteknologi di laboratorium genomik dan perbaikan mutu tanaman. Penulis dapat dihubungi untuk kegiatan penelitian di alamat email kholilah2207@gmail.com.